

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA VAZ SCHITTINI

**CURITIBA
2010**

ANDRESSA VAZ SCHITTINI

**MEIO CONDICIONADO DE EXPLANTE CARDÍACO HUMANO: FATORES
SOLÚVEIS E EFEITO CARDIOMIOGÊNICO NAS CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Alejandro Correa Dominguez

**CURITIBA
2010**

Dedico esse projeto ao pai Xixo,
a mãe Josélia, ao meu irmão André
e ao meu amor Jonas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus porque sei que em muitos momentos de tristeza e alegria Ele esteve e permanece ao meu lado me dando forças.

Aos meus pais e irmão por terem abraçado o desejo do mestrado junto comigo mesmo sabendo que não eu teria condições de renda por dois anos.

Ao pequeno Jonas (Chonas) pelo amor compartilhado e pelo grande companheirismo.

Ao Emerson Borges por ter me ajudado a optar pelo mestrado e mostrado que às vezes é necessário darmos um passo atrás para lançarmos dois à frente.

À todos os meus amigos pelas inúmeras vezes que me descontraíram.

Aos amigos de laboratório Alessandra, Bruno, Crisciele, Jaiesa, Patrícia e Marco pelos ensinamentos e pelo auxílio no crescimento pessoal.

À Dra. Paola Celedon pela paciência e por compartilhar os ensinamentos de gel bidimensional.

Ao Dr. Maurílio pela disponibilidade nos ensinamentos no microscópio e photoshop.

Ao pessoal do preparo Nilson, Tânia, Rafael e Vanessa pelo apoio na vidraria e preparo de soluções.

Ao diretor Dr. Samuel Goldenberg e Marco Krieger pelos auxílios financeiros ao longo do projeto.

Ao Instituto Carlos Chagas e Instituto de Biologia Molecular do Paraná pela estrutura física que possibilitou esse trabalho.

Ao grupo do Laboratório Experimental de Cultivo Celular da PUC-PR pelo isolamento e purificação das células utilizadas nesse trabalho, bem como no fornecimento de alguns anticorpos.

Ao Banco de Hemoenxertos da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba pelo fornecimento dos fragmentos cardíacos utilizados nesse trabalho.

Agradeço ao meu orientador Dr. Alejandro Correa por ter me aceitado como sua aluna de mestrado mesmo sabendo que seríamos muito cobrados por isso. Pelo seu profissionalismo, por compartilhar seu grande conhecimento comigo, por ser extremamente crítico durante minhas apresentações ou projetos escritos, por me cobrar muito nas leituras de artigos, pela paciência nos meus devaneios, que, aliás, eram muitos, por me ajudar a desenvolver “tok” devido ao seu detalhismo, por me ensinar a escrever um artigo mesmo com meu inglês “tabaquinha”, por me ajudar na correção da tese por achar que eu escrevia como uma jornalista para a folha de São Paulo, por achar que sou um citômetro humano quando me propôs contar mais de 1000 células. Tchê sei que você não gosta de sentimentalismo, mas agradeço pela

amizade desenvolvida ao longo desses anos e por colaborar pelo meu crescimento profissional. Muito obrigada.

Como é que você reage às quedas que sofre na vida?
Como é que você administra os fracassos?
Não há receitas mágicas que nos façam vencer os obstáculos.
Mas ousa dizer que há um jeito interessante de olhar
para as quedas que sofremos.
É só não permitir que elas sejam definitivas.
É só não perder de vista a primavera que o outono prepara.
Administre bem os problemas que você tem, não permita que o contrário aconteça.
Se você não administrá-los eles administrarão você.
Deus lhe quer vencedor, a vitória já está preparada feito o presente que
está embrulhado e precisa ser aberto. Não perca tempo!
Já começou vencer aquele que se levantou para recomeçar o caminho.
Pe. Fábio de Melo

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Desenvolvimento cardíaco.....	1
1.2 Infarto Cardíaco.....	6
1.3 Terapia Celular e células tronco.....	7
1.4 Células Tronco Embrionárias.....	8
1.5 Células Tronco Adultas.....	11
1.6 Células Tronco Cardíacas.....	14
1.7 Métodos de Diferenciação das CTMs.....	16
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Aspectos Éticos.....	22
3.2 Local de coleta do material para isolamento do meio condicionado.....	22
3.3 Obtenção do meio condicionado (MC) de explantes cardíacos humanos.....	22
3.4 Análise dos peptídeos do meio condicionado por MALDI-TOF/TOF.....	24
3.4.1 Preparação de amostras de proteínas para SDS-PAGE.....	24
3.4.2 Eletroforese de proteína SDS-PAGE.....	24
3.4.3 Digestão dos polipeptídeos em gel SDS-PAGE.....	24
3.4.4 Preparação de amostras de proteínas para gel bidimensional (2-DE).....	25
3.4.5 Gel 2-DE.....	26
3.4.6 Digestão dos polipeptídeos em gel 2-DE.....	27
3.4.7 Análise dos peptídeos do meio condicionado por MALDI-TOF/TOF.....	27
3.4.8 Análise dos peptídeos do meio condicionado por arranjos de anticorpos.....	27
3.5 Local de coleta de material para isolamento das células tronco mesenquimais (CTMs).....	32
3.6 Isolamento e cultura de CTMs.....	33
3.7 Cultivo das CTMs com MC.....	34
3.8 Avaliação da sobrevivência das CTMs cultivadas com MCs.....	35
3.9 Extração de RNA total.....	35
3.10 Síntese de cDNA pela transcriptase reversa.....	35
3.11 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	36
3.12 Eletroforese de DNA.....	37
3.13 RT-qPCR.....	38
3.14 Imunofluorescência indireta (IFI).....	39
3.15 Análise semi-quantitativa das amostras de imunofluorescência.....	39
4. RESULTADOS.....	41
4.1 Avaliação dos fatores solúveis presentes no meio condicionado.....	41
4.1.1 Identificação das proteínas do sobrenadante da cultura de explantes cardíacos humanos utilizando espectrometria de massas e arranjos de anticorpos.....	41
4.2 Avaliação do efeito dos MCs nas CTMs.....	47
4.2.1 Efeito sobre o número de células.....	47
4.2.2 Efeito sobre a expressão de marcadores cardíacos em nível de mRNA.....	49
4.2.3 Imunolocalização das proteínas cardíacas nas CTMs tratadas com MC.....	51

5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÕES.....	63
7. PERSPECTIVAS.....	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – VIA DE SINALIZAÇÃO DE WNT.....	3
FIGURA 2 – VIA DE SINALIZAÇÃO TGF β /BMP.....	4
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS FILAMENTOS CARDÍACOS.....	6
FIGURA 4 – CULTIVO DE CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS IN VITRO.....	10
FIGURA 5 – CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO DAS CTMS.....	13
FIGURA 6 – SISTEMA DE CULTIVO MIMETIZANDO UM AMBIENTE CARDÍACO.....	18
FIGURA 7 – MODELOS DE CULTIVO DIRETO E INDIRETO.....	19
FIGURA 8 – MODELO DE CULTIVO INDIRETO COM EXPLANTES CARDÍACOS.....	19
FIGURA 9 – CULTIVO DOS FRAGMENTOS DE TECIDO CARDÍACO EM FORMA DE EXPLANTES PARA A OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO.....	23
FIGURA 10 – GEL DE PROTEÍNA 15% UTILIZADO PARA A DIGESTÃO DE PROTEÍNAS DIRETAMENTE DO GEL.....	25
FIGURA 11 – MODELO ESQUEMÁTICO DA HIBRIDIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS NAS MEMBRANAS.....	29
FIGURA 12 – MAPA DOS ARRANJOS DE ANTICORPOS DAS CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO.....	29
FIGURA 13 – SOFTWARE QUE MEDE A INTENSIDADE DOS SPOST DAS MEMBRANAS.....	30
FIGURA 14 – IMPORTAÇÃO DOS DADOS PARA O RAYBIO® ANALYZIS TOOL SOFTWARE.....	31
FIGURA 15 – ALINHAMENTO DOS DADOS.....	31
FIGURA 16 – DADOS FINAIS GERADOS PELO SOFTWARE.....	32
FIGURA 17 – MAPA DOS CULTIVOS DE CÉLULAS.....	34
FIGURA 18 – CONTEÚDO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS NAS AMOSTRAS DE MEIO CONDICIONADO DE TRIPLICATA DE EXPLANTES CARDÍACOS.....	41
FIGURA 19 – PERFIL DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM MC1-3.....	42
FIGURA 20 – GEL 2-DE COM PONTOS ISOELÉTRICOS DE pH 3-10.....	43
FIGURA 21 – GEL 2-DE COM PONTOS ISOELÉTRICOS DE pH 4-7.....	44
FIGURA 22 – CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO PRESENTES NO MEIO CONDICIONADO.....	46
FIGURA 23 – CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO SIGNIFICATIVAMENTE EXPRESSOS NOS MCS.....	47
FIGURA 24 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DAS CÉLULAS TRATADA E NÃO TRATADAS.....	48
FIGURA 25 – GRÁFICO DA RAZÃO DAS MÉDIAS DOS NÚMEROS DE CÉLULAS.....	49
FIGURA 26 – PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES CARDÍACOS E ENDOTELIAIS DAS AMOSTRAS TRATADAS E NÃO TRATADAS NO CULTIVO DE 21 DIAS.....	50
FIGURA 27 – PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES CARDÍACOS E ENDOTELIAIS.....	51
FIGURA 28 – PAINEL DOS ESTUDOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	53
FIGURA 29 – QUANTIDADE DE CTMs POSITIVAS PARA TROPONINA I E TROPONINA T.....	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PARÂMETROS USADOS NA BUSCA DE PROTEÍNAS PELO MASCOT.....	28
TABELA 2 – LISTA DE REAGENTES UTILIZADOS PARA A SÍNTESE DE CDNA..	36
TABELA 3 – PRIMERS UTILIZADOS PARA RT-PCR.....	37
TABELA 4 – TABELA DE DADOS GERADOS PELO PROGRAMA MASCOT.....	45

RESUMO

Neste trabalho o meio condicionado derivado de explante cardíaco humano foi analisado para identificar fatores solúveis liberados pelos explantes e determinar o potencial cardiomiogénico sobre células tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea. Através da utilização de arranjos de anticorpos foi possível identificar muitos fatores de crescimento e citocinas liberados pelos explantes cardíacos. Dentre os fatores liberados pelos explantes cardíacos foram identificados citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, bFGF, IGFBP-1 e IGFBP-2. Além disso também foram realizados géis bidimensionais e espectometria de massas para determinar algumas das proteínas que são liberadas ao meio de cultura. Muitas proteínas estruturais foram identificadas provavelmente devido ao dano do tecido e apoptose. Uma grande parte dos fatores liberados pelos explantes parecem importantes na citoproteção, diferenciação do tecido cardíaco e reparo. Nós hipotetizamos que os explantes cardíacos humanos talvez funcionem como uma fonte de fatores solúveis que talvez tenham influência na indução das CTMs à células semelhantes à cardiomiócitos, ou talvez, à células semelhantes ao endotélio. Assim, a influência do meio condicionado nas CTMs foi analisado através da expressão de genes selecionados por RT-PCR e por imunofluorescência indireta (IFI). Níveis aumentados do mRNA de VEGF, conexina-43, troponina I e troponina T foram observados nas amostras tratadas quando comparadas com o controle. O mRNA de Nkx 2,5, um importante fator transcricional envolvido na cardiomiogênese, foi detectado em duas amostras. As análises da expressão de proteínas e localização por IFI mostram que as CTMs tratadas com meio condicionado tem uma grande quantidade de células positivas para troponina T cardíaca, troponina I cardíaca e α -actinina. Essas células apresentam uma morfologia e núcleo distintos. Embora os níveis de mRNA de conexina-43 pareçam aumentadas nas culturas tratadas, as análises de IFI não mostram diferenças evidentes entre as células tratadas e não tratadas. Nossos resultados sugerem que o meio condicionado de explantes cardíacos humanos talvez funcionem como um modelo *in vitro* para estudar fatores de diferenciação cardíaca, além de futuramente esses fatores serem usados em aplicações clínicas.

ABSTRACT

In the present work conditioned medium by human cardiac explant was analyzed to identify soluble factors released by the explants and to determine the cardiomyogenic potential on bone marrow derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs). By using antibody arrays, it was possible to identify several growth factors and cytokines produced by the human explants. Among the several factors released by the cardiac explants we identified pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, bFGF, IGFBP-1 e IGFBP-2. Besides, two-dimensional gels and mass spectrometry were carried out to determine some of the abundant proteins that are released to the culture medium. Several structural proteins were detected probably due to tissue damage and apoptosis. A great deal of the factors released from the explant seems to be important in cytoprotection, cardiac tissue differentiation and repair. We hypothesized that human cardiac explants may function as a source of soluble factor that might commission MSC differentiation to cardiomyocyte-like and, perhaps, to endothelial-like cells. Thus, the influence of the conditioned medium on BM-MSC was analyzed through the expression of selected genes by RT-PCR/qPCR and by indirect immunofluorescence (IFI). Increased levels of VEGF, Connexin 43, Troponin T and Troponin I mRNAs were observed in the treated samples when compared with the controls. Nkx2.5 mRNA, an important transcription factor involved in cardiomyogenesis, was detected in only two treated sample. The analysis of protein expression and localization by IFI showed that BM-MSCs treated with cardiac explant- conditioned medium had a high number of positive cells for cardiac Troponin T, Troponin I and α -actinin. These cells presented a distinct morphology and nucleus. Even though Connexin 43 mRNA seems to have increased level in the treated cultures, IFI analyses do not show evident differences between treated and not treated cells. Our results suggest that conditioned medium with human cardiac explant might function as an *in vitro* model for studying cardiac differentiation factors; moreover, it might have future clinical applications.

1. INTRODUÇÃO



1.1 Desenvolvimento Cardíaco: vias de sinalização

O desenvolvimento cardíaco depende de muitas vias de sinalização que são responsáveis por ativar ou inibir redes de regulação de transcrição e tradução importantes para a especificação cardíaca (SHIOJIMA & KOMURO, 2005).

Interações entre diferentes tecidos ou camadas germinativas desenvolvem um importante papel no desenvolvimento do coração durante a embriogênese. Fatores solúveis secretados por tecidos endodermis ou ectodermis adjacentes são essenciais para o comprometimento de células mesodermis à linhagem cardíaca (SHIOJIMA & KOMURO, 2005). Assim fatores de crescimento como proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), fator β de crescimento e transformação (TGF- β), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e proteínas Wnt são importantes para a especificação cardíaca (COHEN *et al.*, 2008).

Proteínas Wnt constituem uma grande família de moléculas de sinalização que são secretadas e que regulam aspectos cruciais do desenvolvimento, dentre eles o desenvolvimento cardíaco, diferenciação das células-tronco e renovação celular

(LOGAN & NUSSE, 2004). Sua forma de ação nas células é pela via de sinalização canônica que consiste da ligação das proteínas Wnt a um complexo formado pelo receptor de membrana Frizzled (Fzd) e pelo receptor de lipoproteínas relacionado às proteínas 5/6 (Lrp5/6). Uma vez que Wnt está ligado à seus receptores ocorre a ativação da proteína efetora intracelular Dishevelled (Dv1) que inibe um complexo de proteínas que são responsáveis por fosforilar a β -catenina e levá-la para a via de degradação. Uma vez que a β -catenina se estabiliza no citoplasma, entra e se acumula no núcleo e liga a sítios específicos no DNA ativando a transcrição de genes alvos (FLAHERTY & DAWN, 2008). Entretanto, a ação de Wnt nas células pode ser independente da proteína β -catenina pela via de sinalização não canônica. Nessa via a proteína Wnt se liga aos receptores Fzd e ativa duas vias intracelulares independentes: via Ca^{+2} /proteína quinase C (PKC) e RhoA/JNK (VEEMAN *et al.*, 2003). Na sinalização Ca^{+2} /PKC quando as Wnt se liga ao receptor ocorre ativação das subunidades triméricas da proteína G, que ativa a sinalização intracelular de Ca^{+2} bem como a proteína quinase dependente de Ca^{+2} e proteína quinase dependente de calmodulina. Já na sinalização RhoA/JNK, as proteínas Wnt ativam a família Rho GTPases, tais como a RhoA e Rac (PANDUR *et al.*, 2002) (Figura 1).

Experimentos com células tronco embrionárias de camundongos sugerem que a ativação da via canônica Wnt age no início do desenvolvimento embrionário para potencializar o comprometimento das células à linhagem cardíaca (NAITO *et al.*, 2006), pois quando ocorre o bloqueio dessa via, durante o período inicial da diferenciação, os marcadores cardíacos como o Nkx 2.5 e o aparecimento de cardiomiócitos também são bloqueados (UENO *et al.*, 2007). A ativação da sinalização Wnt canônica na fase inicial da embriogênese induz a diferenciação das células embrionárias em cardiomiócitos, no entanto, é necessário que essa via seja desativada na fase tardia da diferenciação, pois ela inibe a continuação da especificação cardíaca (NAITO *et al.*, 2006).

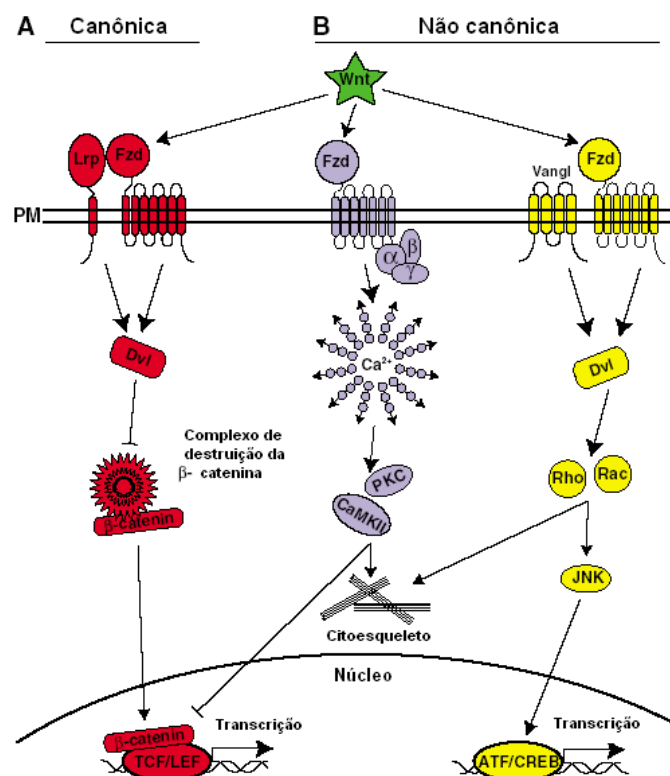


FIGURA 1 - VIA DE SINALIZAÇÃO DE WNT
 FONTE: COHEN & MORISSEY (2008)

Alguns antagonistas da via Wnt canônica, como as proteínas *crescente* e *Dikkopf* (*DKK*), competem pelos receptores de membrana Fzd e Lrp5/6 ativando a via. Recentemente foi descoberto que além dessas duas proteínas, as proteínas de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina-4 (IGFBP-4) induzem a diferenciação das células tronco de carcinoma embrionários *in vitro* e de células de embriões de *Xenopus* em cardiomiócitos *in vivo* antagonizando com a via Wnt/ β -catenina e interagindo diretamente com os receptores Fzd e Lrp5/6 (ZHUO *et al.*, 2008).

TGF- β e BMP são proteínas da família de citocinas que possuem um papel essencial no desenvolvimento embrionário. A ativação da via de sinalização acontece com a ligação das proteínas TGF- β e BMP aos receptores de membrana tipo I e II com a consequente transdução de sinal para as proteínas Smads. As proteínas Smads ativadas se concentram no núcleo e formam um complexo de proteínas Smads que se liga à regiões específicas do DNA regulando a expressão de genes cardíacos específicos (SHI & MASSAGUÉ, 2003) (Figura 2).

No desenvolvimento cardíaco, TGF- β tem a função de induzir a transição das células da epiderme para a mesoderme (YANG & WEINBERG, 2008), originando as válvulas cardíacas (MERCADO PIMENTEL & RUNYAN, 2007). Ratos que não possuem a expressão de TGF- β , não formam as válvulas cardíacas e conseqüentemente mostram um defeito na transmissão do sangue átrio-ventricular (WU & HILL, 2009), enquanto que ratos que não expressam BMP ou um receptor, ou os dois, morrem durante a fase de gastrulação porque não ocorre a septação para a formação de átrio e ventrículo (WIJK *et al.*, 2007).

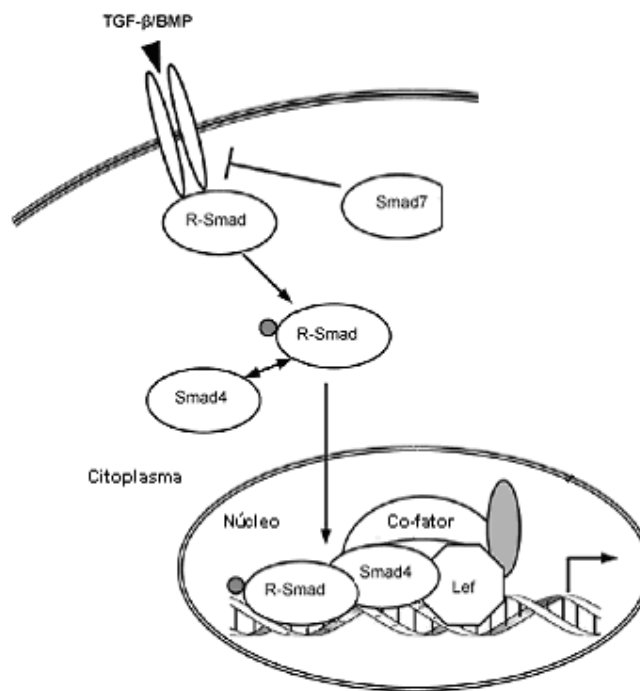


FIGURA 2 – VIA DE SINALIZAÇÃO TGF β /BMP.
FONTE: GUO & WANG (2009)

Os mecanismos de indução e diferenciação de células musculares à cardiomiócitos durante a cardiogênese dependem da expressão de alguns fatores transcricionais, dentre eles o fator transcricional NK2 relacionado ao locus 5 (*Nkx 2.5*). *Nkx 2.5* é um dos cinco genes membros da família *Nkx 2* que são expressos durante o desenvolvimento do coração de vertebrados (SHIOJIMA *et al.*, 1996). Seus genes são expressos na fase inicial do desenvolvimento embrionário e essa expressão se mantém predominante no músculo cardíaco adulto (KOMURO *et al.*, 1993; LINTS *et al.*, 1993). Estudos comprovam que doenças cardíacas congênitas

estão associadas à mutação do gene Nkx 2.5 causando defeitos nos septos atriais e ventriculares, anormalidades nas veias que conduzem o fluxo de sangue para fora do coração e bloqueio da condução átrio-ventricular (TARGOFF *et al.*, 2008). Portanto, sua expressão em células progenitoras do miocárdio embrionário e no coração adulto sugerem um papel na diferenciação da linhagem do miocárdio e na manutenção do fenótipo muscular cardíaco (MABLY & LIEW, 1996).

Os mecanismos de indução de diferenciação de cardiomiócitos durante a cardiogênese não é bem definida, mas acredita-se que durante o processo de gastrulação as proteínas Wnt são expressas, ativando a via de sinalização da β -catenina que promove a migração de células progenitoras para as regiões bilaterais de formação do coração. Com o movimento das células progenitoras, a sinalização de Wnt é inibida pelos fatores *DKK1* e *crescente* e é iniciada a expressão do fator transcricional Nkx 2.5 que até então estava inibida. Uma vez que as progenitoras tenham atingido a posição lateral do coração, Nkx 2.5 ativa a expressão de BMP na endoderme e ectoderme que conseqüentemente potencializa a ativação do fator transcricional Nkx 2.5, promovendo a formação dos sarcômeros e a contração espontânea do coração (WIJK *et al.*, 2007).

Nkx2,5 junto a outros fatores de transcrição como GATA4 acabam induzindo a expressão dos genes estruturais das células cardíacas, por exemplo, genes que codificam as proteínas do sarcômero (THOMAS *et al.*, 2001). O sarcômero é a unidade funcional dos cardiomiócitos (LEAVIS & GERGELY, 1984). Cada sarcômero é composto de um arranjo geométrico de filamentos grossos da miosina, que por sua vez é contornada por filamentos finos de actina e do complexo das troponinas: troponina I, troponina T e troponina C (PARMACEK & SOLARO, 2004) (Figura 3).

Os sarcômeros se conectam uns aos outros através dos discos intercalares que são os responsáveis pela condução dos potenciais eletromecânicos diretamente entre os citoplasmas de células adjacentes via junções gap. As junções gap permitem que os potenciais de ação sejam espalhados diretamente entre as células pela despolarização e repolarização do coração através dos canais de Na^+/K^+ . Esse movimento coordenado de íons permite que o coração desenvolva suas funções normais de sístole e diástole (LI *et al.*, 2009).

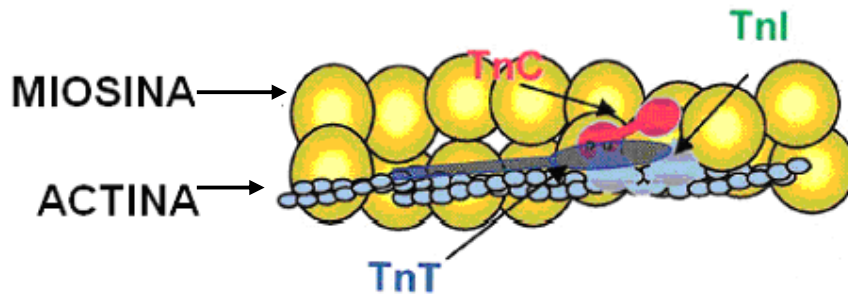


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS FILAMENTOS CARDÍACOS.
 FONTE: PARMACEK & SOLARO (2004).

1.2 Infarto cardíaco

A obstrução da artéria coronária leva ao infarto do miocárdio juntamente com a morte de cardiomiócitos, sobrecarregando as células do miocárdio sobreviventes e levando à falhas cardíacas. Outras causas de falhas cardíacas, incluindo doenças crônicas como a hipertensão, também são caracterizadas por uma diminuição do número de cardiomiócitos (DIWAN *et al*, 2007).

Quando o infarto do miocárdio ocorre, ele gera a morte celular com o rompimento da matriz extracelular e a produção de matriz metaloproteinases (MMP) que sinaliza para que células inflamatórias migrem até o local da lesão. Isso leva ao aumento da produção de citocinas e à subsequente migração, proliferação e diferenciação dos fibroblastos. O excesso de fibroblastos é seguido pela deposição de matriz extracelular resultando na fibrose e formação da cicatriz no tecido danificado (CREEMERS *et al.*, 2001). Os fibroblastos são células de origem mesenquimal que estão envolvidos na manutenção da estrutura cardíaca, incluindo a homeostase da matriz extracelular, produção de fatores de crescimento, citocinas e MMP, além de manter o balanceamento entre a síntese e degradação dos tecidos conectores (BAUDINO *et al.*, 2006).

A formação da cicatriz é essencial para que a ferida causada pelo infarto seja curada rapidamente, pois ela oferece uma barreira mecânica contra demais danos (MUTSAERS *et al.*, 1997). Uma vez que essa cicatriz se torna grande o suficiente para interferir com as funções normais do coração e/ou arritmia, o quadro evolui para uma insuficiência cardíaca congestiva (CHANG & TOWBIN, 2006). A insuficiência cardíaca congestiva ocorre quando o coração não está sendo capaz de bombear o sangue em direção aos tecidos e suprir a necessidade de oxigênio e

nutrientes do organismo, sendo, portanto, causa primária de morte (www.policlin.com.br/drpoli/003/ - acesso em 21/11/09).

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, com índices de 15 milhões de pessoas por ano, segundo a organização mundial da saúde (www.saude.gov.br – acesso em 01/11/09). Pensando na redução dos números de óbitos, desde 2002, numerosas triagens clínicas têm sido realizadas para testar a segurança e eficácia de transplante de células mononucleares derivadas da medula óssea para o tratamento de infarto do miocárdio (BURT *et al.*, 2008). Os resultados iniciais confirmaram a segurança da terapia celular e então despertaram o entusiasmo para o transplante de células tronco.

1.3 Terapia Celular e células tronco

Terapia celular é um método que se baseia na substituição de células mortas através do transplante de células novas viáveis, restaurando assim a função de um órgão ou tecido. Há anos esse método vem sendo empregado na cura de leucemias através do transplante de medula óssea, em que a medula óssea doente é substituída por células de medula óssea saudáveis (NIH – <http://stemcells.nih.gov/info> - acesso em 22/11/09).

De acordo com Sell (2004) a terapia celular pode ocorrer de várias formas:

- transplantes de células tronco autólogas (do próprio paciente) ou alogênicas (de outro doador);
- transplantes de células funcionais maduras;
- a aplicação de células humanas modificadas que são usadas para produzir uma substância necessária, como por exemplo, a insulina (KIM *et al.*, 2009);
- os xenotransplantes (transplante de células, tecidos ou órgãos que estejam se dividindo, de uma espécie para outra) utilizado, por exemplo, para estudar doenças degenerativas de humanos em ratos através da implantação de células neurais no cérebro (KELLY *et al.*, 2009).

Atualmente a terapia celular com a utilização de células tronco tem ganhado destaque entre a comunidade científica, na tentativa de cura de doenças como diabetes (REINDERS *et al.*, 2009) ou regeneração de tecidos perdidos como a pele (MANSBRIDGE, 2009).

As células tronco são células que tem a capacidade de se autorrenovar e diferenciar em outros tipos celulares (NIH – <http://stemcells.nih.gov/info> - acesso em 22/11/09). A autorrenovação das células tronco consiste na capacidade de se dividirem e formarem células filhas com o mesmo potencial (AMIT *et al*, 2000). De acordo com o potencial de diferenciação das células tronco, elas podem ser classificadas em: totipotentes, que são capazes de gerar qualquer célula do corpo inclusive os anexos embrionários: placenta e cordão umbilical; pluripotentes, que tem a capacidade de originar os três folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme) e multipotentes, que possuem a capacidade de gerar apenas alguns tipos de células, normalmente se restringe ao tipo celular de um mesmo folheto embrionário (NIH – <http://stemcells.nih.gov/info> - acesso em 22/11/09).

1.4 Células Tronco Embrionárias:

As células tronco embrionárias (CTEs) são derivadas da massa interna do blastocisto de embriões obtidos de óvulos fertilizados *in vitro*. Logo após a fertilização do óvulo ocorre a formação do zigoto, uma célula totipotente, que ao sofrer uma sucessão de divisões forma a mórula. Cada célula dessa mórula também é totipotente. O estágio seguinte é a formação do blastocisto e é de onde as CTEs são isoladas para utilização *in vitro* (MONTROYA *et al.*, 2005). Essas células não estão presentes no organismo adulto, mas apenas por um pequeno período durante o desenvolvimento embrionário (HABIB *et al.*, 2008). As CTEs são cultivadas em placas coberta com fibroblastos embrionários de camundongo ou humanos (*feeder layer*), onde poderão ser propagadas indefinidamente mantendo seu estado indiferenciado ou induzidas a diferenciar em tipos celulares determinados, dependendo do estímulo (RICHARDS *et al.*, 2002). Se mantidas no estado indiferenciado tanto as CTEs quanto seus clones mantêm a pluripotência, o cariótipo diplóide normal e mostram uma alta atividade da telomerase durante a propagação em cultura (GRIVENNIKOV, 2008). No entanto, quando essas células são retiradas dessa camada de alimentação elas espontaneamente formam grupos de células diferenciadas denominadas de corpos embrióides, que contém células derivadas das três camadas germinativas: endoderme, mesoderme e ectoderme (MURRY & KELLER, 2008) (Figura 4).

Kehat (2001) e colaboradores foram os primeiros a descrever um sistema reprodutível de diferenciação das CTEs à cardiomiócitos *in vitro*. Nesse sistema as CTEs foram induzidas a formar corpos embrióides que já no 4º dia apresentavam contrações rítmicas em áreas pequenas. O sucesso da diferenciação foi comprovado através da expressão de marcadores específicos de cardiomiócitos, além da análise eletrofisiológica demonstrando que os corpos embrióides possuem cardiomiócitos que se assemelham à miócitos embrionários (KEHAT *et al.*, 2001). Em 2004, Kehat e colaboradores descreveram o primeiro transplante de CTEs murinas diferenciadas em cardiomiócitos em coração de suínos e mostrou que essas células transplantadas se integraram fisicamente e mecanicamente no coração. Em um outro estudo, quando CTEs murinas diferenciadas à cardiomiócitos são transplantadas em ratos com danos isquêmicos do miocárdio, ocorre uma melhora da função cardíaca e elas permanecem viáveis por no mínimo 4 semanas (YANG *et al.*, 2008).

No entanto, as possíveis terapias baseadas com as CTEs apresentam algumas barreiras, dentre elas está a formação de teratomas. Quando corpos embrióides derivados de linhagens humanas de células tronco embrionárias são injetados em camundongos imunodeprimidos, eles dividem e diferenciam descontroladamente formando teratomas, tumores que contém células derivadas das três linhagens germinativas (THOMSON *et al.*, 1998) além de apresentarem marcadores similares aqueles encontrados em tumores malignos (BLUM & BENVENISTY, 2008). O gradiente de Percoll é uma técnica que poderia auxiliar na purificação de células diferenciadas a partir de corpos embrióides, entretanto esse método não exclui completamente a presença de outras CTEs indiferenciadas (CHRISTOFOROU & GEARHART, 2007).

Outra limitação na utilização das CTEs são os problemas com a histocompatibilidade porque as CTEs expressam uma subclasse de antígenos leucocitários humanos (HLA) o que leva a rejeição das células enxertadas no órgão (LAFLAME & MURRY, 2005). O uso de imunossupressores seria uma alternativa, mas de acordo com Silverman (1987) a concomitante aplicação de imunossupressores com as CTEs prejudica o miocárdio danificado (SILVERMAN & PFEIFER, 1987).

Além das limitações já citadas acima a maior dificuldade na utilização das CTEs se encontra nas restrições éticas devido ao uso de embriões humanos (CHAPMAN 2009).

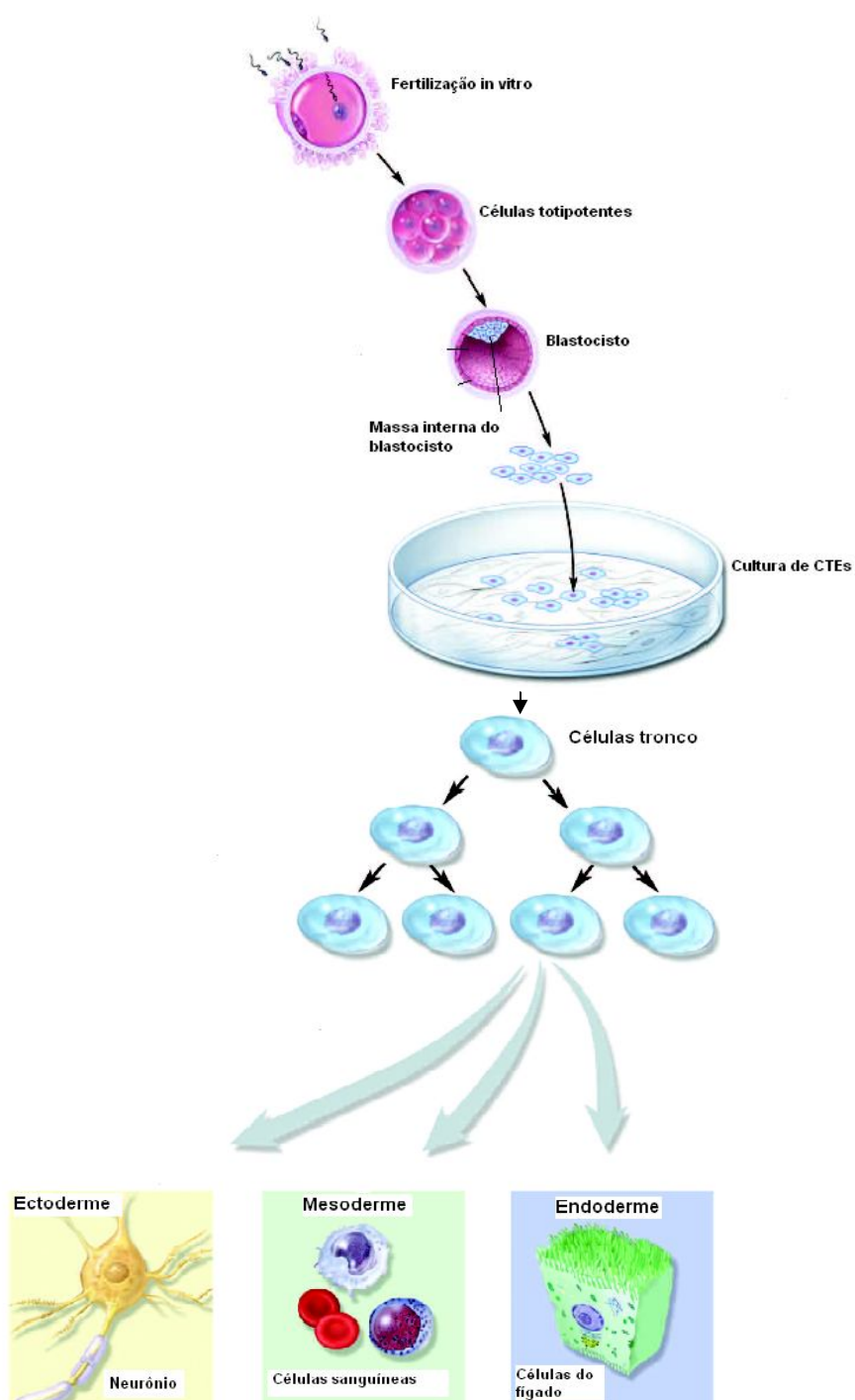


FIGURA 4– CULTIVO DE CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS IN VITRO
FONTE: Livro: “stem cells: scientific progress and future research directions” (2001)
NOTA: As CTEs podem originar células das três linhagens germinativas: endoderme, mesoderme e ectoderme.

1.5 Células Tronco Adultas:

Uma alternativa para contornar os problemas com a utilização de CTEs é a utilização de células tronco adultas (CTAs).

As CTAs são células indiferenciadas que se encontram entre células diferenciadas de um tecido ou órgão, que podem se autorrenovar mantendo sua população indiferenciada (PEKOVIC & HUTCHISON, 2008), ou podem se diferenciar no tipo de células especializadas daquele tecido em que ela se encontra (CAPLAN & DENNIS, 2006). Sua função primária no tecido é manter e reparar o tecido em que ela se encontra (NIH – <http://stemcells.nih.gov/info> - acesso em 22/11/09).

As CTAs residem em um nicho tecidual específico onde permanecem sem se dividir a menos que sejam ativadas por uma necessidade normal de manutenção do tecido ou devido à doenças ou danos no tecido causado por infartos, por exemplo (NIH – <http://stemcells.nih.gov/info> - acesso em 22/11/09). Os mecanismos prováveis pelos quais as CTAs agem na recuperação do tecido danificado como no caso do coração são: (a) proteção dos cardiomiócitos da morte por apoptose; (b) liberação de fatores de efeito parácrino como as citocinas, que auxiliam, por exemplo, na angiogênese; (c) mobilização de células tronco cardíacas residentes (ou mesmo da medula óssea) para reparar as células danificadas (d) indução da proliferação de cardiomiócitos endógenos (ELGEMANN & FRANZ, 2006).

Embora apresente uma capacidade de diferenciação mais limitada quando comparada com as CTEs, o fato das CTAs não formarem teratomas, poderem ser extraídas do próprio paciente, evitando assim problemas com rejeição, e de serem eticamente aceitas para manipulação *in vitro* e aplicação *in vivo*, as CTAs tornaram-se muito atrativas para seu uso na terapia celular (PATEL *et al.*, 2008). A principal fonte de CTAs é a medula óssea que contém diferentes populações celulares com capacidade de migrar e transdiferenciar em células de diferentes fenótipos. Basicamente, na medula óssea podemos encontrar duas populações de CTAs: células tronco hematopoéticas (CTHs) e célula tronco mesenquimais (CTMs) (GERSH *et al.*, 2009).

As células tronco hematopoéticas possuem a capacidade de se autorrenovar e diferenciar em células sanguíneas das linhagens mielóides e linfóides. Assim, dependendo da necessidade que o organismo e/ou tecido apresentem, elas são capazes de balancear entre as vias de diferenciação e/ou autorrenovação das

células sanguíneas (RATAJCZAK *et al.*, 2008). Numerosos estudos mostram a eficácia na melhora da função cardíaca quando as CTHs são injetadas diretamente no órgão ou mobilizadas de seus reservatórios (ORLIC *et al.*, 2001; ROTA *et al.*, 2007). Porém, a melhora da função ocorre por efeitos secundários como liberação de citocinas e não pela própria diferenciação das CTHs (MURRY *et al.*, 2004; KAMIHATA *et al.*, 2001).

Juntamente com as CTHs estão as CTMs que também se encontram na medula óssea, sendo que a forma de separação das duas linhagens (CTHs e CTMs) *in vitro* é baseada na propriedade que as CTMs apresentam de aderir ao plástico, além de marcadores de superfície celular que se expressam apenas nas CTMs (NESSELMAN *et al.*, 2008). Em 2006, a Sociedade Internacional para Terapia Celular propôs três critérios para definir CTMs: (1) aderência ao plástico quando mantidas em meios de cultura padrão, (2) expressão de marcadores mesenquimais: CD105, CD73 e CD90 e ausência na expressão de marcadores hematopoiéticos: CD45, CD34, CD14, CD79 e HLA-DR e (3) capacidade de diferenciar, no mínimo, nas três linhagens mesodermiais: osteoblastos, condrócitos e adipócitos quando cultivadas com meio próprio de indução (DOMINICI *et al.*, 2006). A morfologia semelhante ao fibroblasto juntamente com os critérios definidos acima caracteriza as CTMs *in vitro* (PITTENGER *et al.*, 1999) (Figura 5).

Tradicionalmente a medula óssea é a principal fonte de obtenção de CTMs, com 100% de eficiência em seu isolamento (REBELLATO *et al.*, 2008), mas outras fontes como tecido adiposo (ZHANG *et al.*, 2009) e sangue do cordão umbilical (KESTENDJIEVA *et al.*, 2008) também são usados para isolar células semelhantes à CTMs. As eficiências de isolamento destas fontes alternativas são de 100% e de 30% respectivamente (REBELLATO *et al.*, 2008).

A grande dificuldade da terapia celular utilizando as CTMs se deve ao seu reduzido número nos tecidos, por exemplo, as CTMs da medula óssea apresentam uma frequência de aproximadamente 0,05% da fração celular (STRAUER & KORNOWSKI, 2003) enquanto que as CTMs de tecido adiposo representam cerca de 0,5% do tecido (DE UGARTE *et al.*, 2003). Para que a terapia celular seja eficiente, há a necessidade de expansão dessas células *in vitro* (GUILLOT *et al.*, 2007). Entretanto, as CTMs isoladas da medula óssea entram num processo de “envelhecimento celular *in vitro*” após a terceira passagem (IZADPANA *et al.*,

2006), enquanto que as CTMs derivadas do tecido adiposo após a quinta passagem (WALL *et al.*, 2007; POUNTOS *et al.*, 2007; KERN *et al.*, 2008).

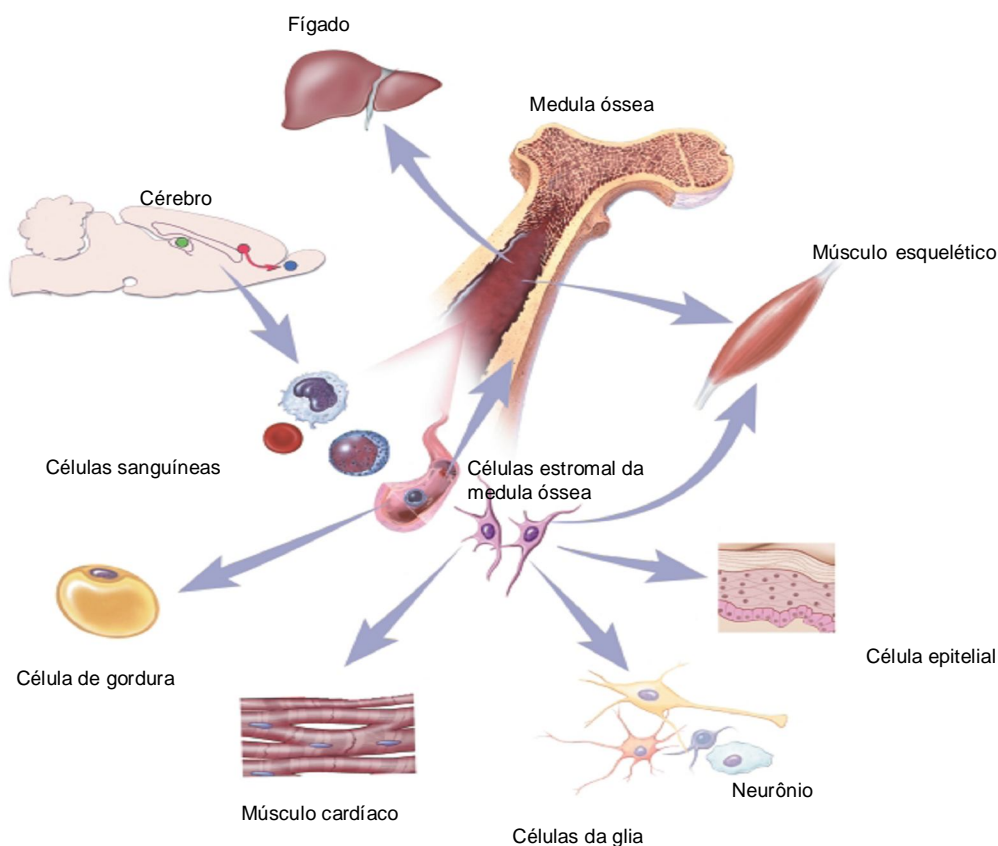


FIGURA 5 – CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO DAS CTMS

FONTE: stem cells: scientific progress and future research directions (2001)

NOTA: As CTMs são capazes de diferenciar em várias linhagens específicas dependendo do microambiente em que elas se desenvolvem.

As CTMs exibem um grande potencial de diferenciação não somente em condrócitos, adipócitos e osteoblastos (WEIR *et al.*, 2008), mas também em outros tipos celulares como cardiomiócitos (COLLINS & RUSSEL, 2009) (Figura 5). Porém a eficiência de diferenciação das CTMs *in vitro* é ainda muito baixa (MARTIN-RENDON, 2008; MADONNA, 2009) Com o advento da proteômica, muitos trabalhos vêm procurando entender quais são as diferenças entre as CTMs derivadas das diferentes fontes (LI *et al.*, 2009), quais são as diferenças delas em relação as CTEs (ROCHE *et al.*, 2009) como ocorre a regulação dentro das células (MAREDDY *et al.*, 2009) dentre outros questionamentos. Park (2007) e colaboradores, utilizando espectrometria de massa, tentou desvendar as proteínas envolvidas no metabolismo, desenvolvimento, autorrenovação e diferenciação. Roche (2009) ao estudar o perfil

de proteínas das CTMs isoladas da medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical mostrou que as CTMs derivadas do tecido adiposo e medula óssea possuem uma expressão de proteínas muito próximas em torno de 68%, enquanto que o cordão umbilical apresenta um perfil de proteína semelhante as CTEs. Já Schinköthe (2008) com a utilização de arranjos de anticorpos desvendou quais são as proteínas liberadas pelas CTMs e descobriu que dentre esses fatores estão proteínas anti-apoptóticas, imunossupressoras, com função na proliferação e moduladoras da angiogênese.

1.6 Células Tronco Cardíacas

A capacidade regenerativa do miocárdio humano é inadequada para compensar a severa diminuição de células do músculo cardíaco perdidas devido ao infarto ou outras doenças do miocárdio. No entanto, o músculo esquelético em mamíferos pode regenerar eficientemente, mesmo após danos freqüentes (SEGERS *et al.*, 2008).

Por um longo tempo o coração foi considerado um órgão terminalmente diferenciado, pois as células que ali permaneciam não tinham a capacidade de retornar ao ciclo celular e assim sofrer mitose, sendo que a única resposta para a injúria era a hipertrofia de cardiomiócitos viáveis remanescentes, resultando no aumento da massa cardíaca (BARILE *et al.*, 2007; LYNGBAEK *et al.*, 2007).

Mais recentemente, foi descoberto que o coração adulto contém um conjunto de células tronco progenitoras cardíacas que podem repovoar a população de cardiomiócitos, com certas limitações, assim como regenerar as veias coronárias (TORELLA *et al.*, 2007). O grupo de Anversa (2001) foi que primeiro identificou e caracterizou uma sub-população distinta de células denominadas de células-tronco residentes cardíacas (CTC) ou células progenitoras cardíacas em humanos. Essa sub-população de miócitos não estavam terminalmente diferenciados, pois voltaram a se dividir logo após um infarto.

Pensando no uso de CTCs para a terapia celular, em 2004 Messina e colaboradores foram quem primeiro descreveram o isolamento de CTCs a partir de espécimes de biopsias cardíacas humanas. Esses fragmentos cardíacos foram cultivados na forma de explantes e foi observado que as CTCs migraram dos explantes para a placa de cultivo formando uma monocamada de células. Essas

células foram caracterizadas por Beltrami (2003) como positivas para um marcador cardíaco (c-kit), com características de autorrenovação, capacidade de formar clones, multipotente e podendo originar no mínimo três linhagens diferentes de células cardíacas: miócitos, células musculares lisas e células endoteliais.

As CTCs parecem residir em nichos especializados responsáveis pelo crescimento e manutenção da população de células tronco (MOORE & LEMISCHKA, 2006).

Pesquisas mostram que as CTCs têm uma capacidade limitada de regeneração do tecido cardíaco. As CTCs são capazes de reparar pequenos danos do miocárdio, como por exemplo, o estouro de um vaso de pequeno calibre ou microinfartos. Entretanto, quando danos maiores ocorrem (BALLARD & EDELBERG, 2008), elas falham por causa da baixa quantidade de células que residem no coração (BARILE, 2007), além de não sobreviverem à falta de oxigênio causado pela insuficiência cardíaca, sofrendo assim apoptose junto com o miocárdio maduro (JOGGERTS & HATZOPOULOS, 2009).

Quando se trata do potencial da terapia celular usando as CTCs há uma grande limitação quanto ao seu isolamento e expansão *in vitro* (VAN VLIET *et al.*, 2008). Além disso, Van Vliet (2008) mostrou em camundongos que os benefícios que as CTCs promovem são devido à neovascularização e formação de novas artérias, mas não pela substituição do cardiomiócito danificado.

Bengel e colaboradores (2005) observaram que as CTCs que foram injetadas apresentaram uma baixa ou nenhuma diferenciação em cardiomiócitos. Com isso, ele sugeriu que as CTCs residentes liberariam fatores parácrinos em resposta à injúria causada pelo infarto. Esses fatores ativariam as células tronco adultas residentes ou induziriam a mobilização e a circulação (homing) das células tronco através da corrente sanguínea de outros tecidos ao local danificado (BENGEL *et al.*, 2005).

De acordo com Urbich e colaboradores (2005) e Cho e colaboradores (2007) os efeitos reparadores dos fatores parácrinos liberados pelas CTCs residentes ou transplantadas são: proteção do miocárdio através da liberação de moléculas como fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF), que reduzem a apoptose e necrose, aumentando, assim a sobrevivência dos cardiomiócitos (GNECCHI *et al.*, 2005); formação de novos vasos envolvendo mediadores como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que levariam ao processo de formação de novas artérias

e portanto, melhorando o fluxo sanguíneo (KINNAIRD *et al.*, 2004); remodelamento cardíaco pelo recrutamento de CTCs que expressam marcadores como MMPs que estão envolvidas na síntese da matriz extracelular (OHNISHI *et al.*, 2007); melhora da contratilidade cardíaca pelos efeitos de fatores inotrópicos que impedem o aumento do infarto (Li *et al.*, 2006) e regeneração cardíaca através de fatores como fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1), que induziriam as CTCs a diferenciarem em cardiomiócitos (LINKE *et al.*, 2005).

1.7 Métodos de Diferenciação das CTMs

A terapia celular baseada em CTMs é uma grande possibilidade para o reparo cardíaco. Estudos pré-clínicos usando CTMs transplantadas em coração de ratos pós infarto demonstram uma melhora na função ventricular, redução no tamanho do infarto (GRAUSS *et al.*, 2008) e diminuição na mortalidade (MIYAHARA *et al.*, 2006). Injeção de CTMs isoladas de medula óssea em humanos também demonstraram uma melhora da fração de ejeção cardíaca (BROFMAN *et al.*, 2004), no entanto, essa melhora não se estende por períodos maiores de um ano (BROFMAN, comunicação pessoal).

Embora as CTMs apresentem uma grande capacidade de expansão *in vitro*, e uma potencialidade de diferenciação, quando se trata do transplante de CTMs *in vivo* para a cardiomioplastia, é preciso que uma grande quantidade de células seja transplantada ao local danificado, uma vez que apenas uma pequena porção das CTMs transplantadas permanecem viáveis no miocárdio (RANGAPPA *et al.*, 2003). Outro problema corrente com as técnicas de cardiomioplastia é que as células injetadas no tecido danificado não integram com os cardiomiócitos nativos para a melhora da função eletromecânica. O benefício máximo poderia ser obtido se as células transplantadas tivessem a capacidade de se diferenciar em cardiomiócitos que completamente se integrassem no miocárdio (RANGAPPA *et al.*, 2003).

Possivelmente a pré-diferenciação ou pelo menos o comprometimento das células em uma linhagem específica *in vitro*, antes do transplante, poderia permitir um maior aproveitamento das células-tronco transplantadas, tanto para que diferenciem na linhagem desejada ou para que os sinais parácrinos sejam mais específicos. O comprometimento das CTMs à linhagem específica, como cardiomiócitos, é influenciado pelo microambiente que as células estão sendo

cultivadas (LIU *et al*, 2009). A diferenciação das células-tronco a cardiomiócitos poderia ser alcançada através de técnicas como co-cultura, uso de químicos sintéticos entre outros, utilizadas conjuntamente, o que ativaria múltiplas vias de sinalização, e mimetizando essas vias *in vitro* (HENG *et al*, 2004).

O tratamento das CTMs com químicos sintéticos como a 5-azacitidina é um dos métodos mais utilizados para diferenciar CTMs à cardiomiócitos (ANTONISTIS *et al*, 2007; BURLACU *et al*, 2008). A 5-azacitidina é um nucleosídeo sintético que inibe a metilação de DNA impedindo o silenciamento de alguns genes, de forma randômica, resultando em efeitos genotóxicos (LI, *et al*, 2007; ZHANG *et al*, 2009). Ainda, a diferenciação induzida pela 5-azacitidina é altamente ineficiente em células tronco adultas. Martin-Rendon e colaboradores (2008) mostraram que apenas 0,07% das CTMs isoladas de medula óssea cultivadas *in vitro* e tratadas com 5-azacitidina diferenciaram em cardiomiócitos. Madonna e colaboradores (2009) estudaram a potencialidade de diferenciação das CTMs isoladas de tecido adiposo com 5-azacitidina e comprovou que somente 0,02%-0,07% diferenciam em cardiomiócitos.

Conjuntamente com o estímulo químico, o estímulo físico pode ser agregado para aumentar o potencial de diferenciação das CTMs à cardiomiócitos. Ge *et al*. (2009), utilizou uma câmara que mimetiza o ambiente cardíaco. A câmara é fechada com uma membrana de gel de sílica, que é a responsável pelo sistema de pressão. Tanto a pressão quanto a passagem do fluido são controlados por computadores para permitir que a amplitude, pressão e duração dos estímulos sejam iguais aos de um coração (Figura 6). Quando as CTMs isoladas de camundongos são tratadas com meio condicionado de extratos cardíacos juntamente com o estímulo físico, a tensão conferida pela passagem do fluido, as células expressam marcadores cardíacos como conexina-43 e Nkx2,5.

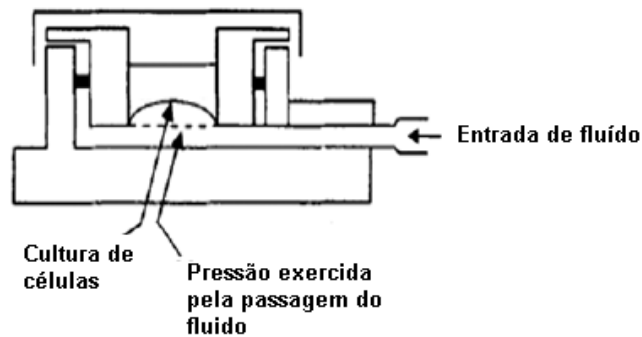


FIGURA 6 - SISTEMA DE CULTIVO MIMETIZANDO UM AMBIENTE CARDÍACO.

FONTE: GE (2009)

NOTA: As células são cultivadas acima de uma membrana (indicado pela flecha) que está sujeita ao efeito da passagem de um fluido, mimetizando uma corrente sanguínea.

Um outro método de diferenciação amplamente utilizado é a co-cultura que pode ser tanto direta quanto indireta. As CTMs indiferenciadas são cultivadas com células diferenciadas (KONINCKX *et al*, 2009; LI *et al*, 2009). A diferença entre as técnicas é que na co-cultura direta (Figura 7.A) as células estão em contato íntimo propiciando uma maior eficiência na transdução de sinais moleculares que induzem a diferenciação. Os receptores de superfície das células estão em contato físico direto, o que permite uma maior interação dos fatores solúveis liberados de maneira parácrina e/ou autócrina entre as células. A co-cultura direta fornece um ambiente fisiológico mais parecido com as condições *in vivo* de tecido e órgãos. Porém, nesse método existe a dificuldade na separação das células diferenciadas das indiferenciadas (PLOTNIKOV *et al.*, 2007). Já no co-cultivo indireto (Figura 7.B) as células são separadas por uma membrana semi-permeável, permitindo que ambas estejam sujeitas apenas aos efeitos parácrinos uma da outra, além de facilitar a separação da população diferenciada da indiferenciada (HENG *et al.*; 2004).

Li *et al* (2008) afirmam que o método de co-cultivo indireto é suficiente para diferenciar as CTMs em cardiomiócitos sem o contato físico.

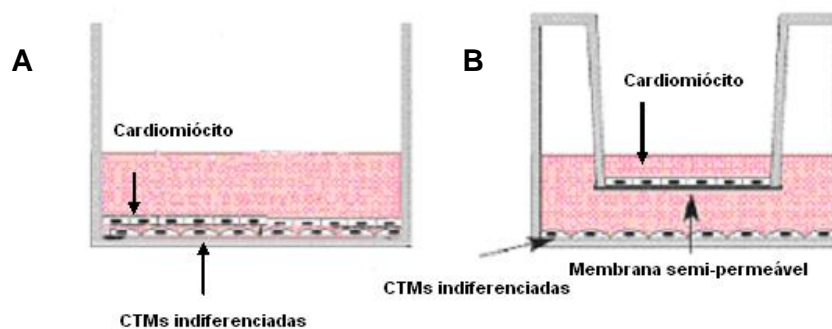


FIGURA 7 – MODELOS DE CO-CULTIVO DIRETO E INDIRETO

FONTE: www.biocompare.com (22/11/09)

NOTA: Co-cultura de CTMs com células diferenciadas. A. co-cultivo direto; B. co-cultivo indireto

Portanto, na co-cultura indireta as células estariam sujeitas exclusivamente aos fatores do meio. Segundo Nakanishi *et al* (2008), o meio condicionado é suficiente para diferenciação das células tronco e evita a utilização de membranas semi-permeáveis. No modelo proposto por Nakanishi *et al* (2008) as células progenitoras cardíacas cultivadas com meio condicionado de CTMs diferenciaram em células semelhantes a cardiomiócitos.

As vantagens dessa técnica é que o meio condicionado pode ser filtrado, eliminando o risco de contaminação com um tipo celular diferente e pode ser congelado para ser usado posteriormente (MALEKSHAH *et al.*, 2006).

Recentemente, foi descrito uma metodologia de co-cultivo indireto em que são utilizados fragmentos de tecido adulto (cartilagem murino), na forma de explantes, para diferenciar as CTMs em condrócitos (AHMED *et al*, 2007). Neste novo tipo de cultivo, as CTMs estão sujeitas apenas aos fatores parácrinos liberados dos explantes como VEGF e TGF- β (Figura 8).

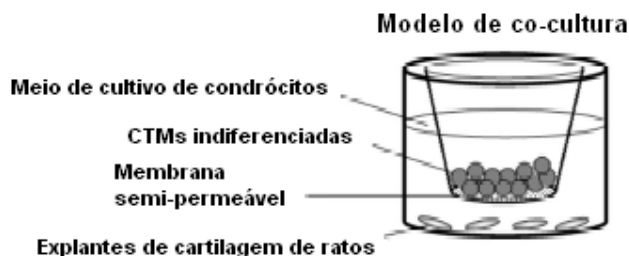


FIGURA 8 – MODELO DE CO-CULTIVO INDIRETO COM EXPLANTES CARDÍACOS

FONTE: AHMED (2007)

NOTA: As CTMs ficam sujeitas aos fatores parácrinos liberados pelos explantes

A vantagem dessa metodologia é que as CTMs estarão sob influência dos fatores solúveis originários do tecido de interesse.

Prowse (2005) e Chin (2007), através de técnicas de proteômica utilizando (LC-MS/MS) e arranjos de anticorpos respectivamente, procuraram identificar proteínas presentes no meio condicionado que auxiliariam as CTEs no processo de manutenção da proliferação e diferenciação. Em ambos os trabalhos foram listadas uma grande quantidade de proteínas envolvidas nestes processos.

Após o infarto cardíaco, uma cascata de eventos ocorre no tecido danificado como: a apoptose e necrose do tecido danificado, hipertrofia dos miócitos cardíacos, fibrose, diminuição da contratilidade, inflamação e stress oxidativo. E grande parte dos eventos de regeneração cardíaca ocorre através dos mecanismos parácrinos. Embora se tenham hipóteses de como os fatores parácrinos podem auxiliar no processo de regeneração, ainda não se sabe quais são de fato os efeitos desses fatores nas CTMs humanas.

Assim, se faz necessário entender qual é o efeito que as moléculas liberadas pelo tecido cardíaco têm nas CTMs. A hipótese deste trabalho foi que da mesma forma que o tecido cartilaginoso foi utilizado para induzir as CTMs a diferenciarem em condrócitos através da liberação de fatores do próprio tecido, fragmentos de tecido cardíaco poderiam servir como fonte de fatores parácrinos semelhantes aos fatores liberados do tecido cardíaco *in vivo*, para diferenciar CTMs a cardiomiócitos com eficiência maior às descritas até hoje.

Nesse contexto, o presente trabalho é inédito na obtenção do meio condicionado de explantes cardíacos humanos e na padronização de um protocolo para extração de proteínas de meio condicionado para sua avaliação em gel bidimensional e espectrometria de massas (2DE/MALDI-TOF/TOF). Ainda, esse é o primeiro trabalho que descreve um cultivo de CTMs com meio condicionado a partir de material humano cardíaco e a avaliação do efeito desse meio no processo de indução da diferenciação de CTMs à células semelhantes a cardiomiócitos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter meio condicionado a partir de explantes cardíacos humanos para identificar os fatores solúveis presentes e avaliar o efeito cardiomiogênico nas células tronco mesenquimais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Isolar explantes cardíacos de coração humano, cultivar e obter os meios condicionados;
- 2.2.2 Identificar proteínas do sobrenadante de cultura de explantes cardíacos humanos utilizando espectometria de massas e arranjos de anticorpos.
- 2.2.3 Cultivar CTMs humanas isoladas de medula óssea com meio condicionado de explantes cardíacos humanos;
- 2.2.4 Avaliar o número de células das CTMs tratadas com meio condicionado em comparação com células não tratadas (controle);
- 2.2.5 Estudar a expressão de genes cardíacos em nível de mRNA por PCR em tempo real e RT-PCR em CTMs cultivadas com meio condicionado (MC) e com meio não condicionado (MNC);
- 2.2.6 Estudar a localização de algumas proteínas cardíacas específicas por imunofluorescência indireta.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Esse trabalho faz parte de um projeto de pesquisa intitulado "Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais adultas: aplicação em terapias celulares do sistema cardiovascular", que foi submetido no dia 20 de setembro de 2007 ao CEP/FIOCRUZ e foi aprovado pelo comitê de ética na reunião do dia 15 de setembro 2007 sob o número 419/07.

3.2 Local de coleta do material para isolamento dos explantes cardíacos

Fragmentos do tecido cardíaco humano foram obtidos a partir do material excedente da dissecação de válvulas cardíacas humanas realizado pelo Banco de Homoenxertos da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba (BHSC). Este material é descartado após a dissecação de válvulas cardíacas, podendo ser utilizado para fins de pesquisa científica de acordo com a Legislação Brasileira vigente, Portaria GM nº 263 de 31 de março de 1999. Esta portaria define que tecidos, órgãos ou partes do corpo humano só podem ser utilizados para fins científicos, depois de esgotadas todas as possibilidades de sua utilização em transplantes – aprovado pelo comitê de ética da FIOCRUZ.

3.3 Obtenção do meio condicionado (MC) de explantes cardíacos humanos

Os fragmentos cardíacos isolados são transferidos para um tubo falcon de 50 mL contendo meio de cultura Iscove's Modified Dulbecco's (IMDM) (GIBCO™ Invitrogen, NY, USA), suplementados com 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO™ Invitrogen, NY, USA) e 100 U/mL de penicilina (GIBCO™ Invitrogen, NY, USA) e então transportados até o lugar próprio para a manipulação.

Os fragmentos cardíacos foram pesados e 1,2 g de fragmentos atriais e ventriculares cardíacos foram processados mecanicamente com o bisturi, dissociados em pedaços de 1 mm³, transferidos para um tubo falcon estéril e lavados com PBS para remover restos celulares e sangue. Os explantes foram distribuídos igualmente e de forma homogênea em quatro frascos de cultivo de 75

cm² (150mg/frasco) (TPP, Trasadigen, Switzerland). Logo após foi adicionado, ao lado oposto de onde estavam os explantes, 20 mL de meio IMDM suplementado com 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina em cada garrafa. Os frascos foram incubados por 60 min em estufa umidificada a 37°C com 5% de tensão de CO₂, com o lado dos explantes voltados para cima. Após esse período a garrafa era virada lentamente para que o meio pudesse cobrir os explantes (Figura 9).



FIGURA 9 - CULTIVO DOS FRAGMENTOS DE TECIDO CARDÍACO EM FORMA DE EXPLANTES PARA A OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO.
FONTE: Fotos de Itamar Crispin (2008).

Os explantes foram cultivados em meio IMDM por seis dias com coleta do meio a cada dois dias. Ao final da cultura, o meio coletado foi filtrado através de membranas com tamanho de poro de 0,70 µm (BD falcon cell strain), filtrado novamente com um sistema de filtração à vácuo de 0,22 µm TPP (Vakum filtration system 250 mL) e mantido em -20°C até serem usados. Foram obtidas 4 amostras de MC a partir de 4 doadores independentes. Entretanto, devido ao fato da 4ª amostra ser obtida após o início dos experimentos, ela só foi utilizada para a análise de proteínas por arranjo de anticorpos (descrito em 3.4.8) e não para os demais experimentos.

3.4 Análise das proteínas do meio condicionado

3.4.1 Preparação de amostras de proteínas para SDS-PAGE

Um dia antes de serem utilizados, os meios condicionados foram descongelados lentamente na câmara fria dentro de um isopor com gelo e 24 h depois as proteínas foram precipitadas por 1 h em gelo com 10% de ácido trifluoroacético (TCA-MERCK) e centrifugados a 12000 x g por 15 min a 4°C. Os precipitados foram lavados duas vezes com acetona 100% e uma vez com acetona 80%, sendo recuperados em cada etapa por centrifugação a 12000 x g por 15 min a 4°C. Em seguida o pellet foi ressuscitado em uma solução de 7 M de uréia e 2 M de thiourea. O mesmo procedimento foi realizado com o MNC. As concentrações de ácidos nucleicos nos MCs foram determinadas por espectrofotometria (Nanodrop-Spectrophotometer ND-100-UNISCIENCE).

3.4.2 Eletroforese de proteína SDS-PAGE

5 µL do precipitado da amostra de cada meio condicionado, diluído em 7 µL de água e 4 µL de tampão de amostra, foram aplicados em gel de poliacrilamida a 15%, submetidas a uma corrente elétrica de 20 mA e uma voltagem de 120V. Para a visualização das proteínas, elas foram coradas com solução de *Comassie Blue* R-250 por 30 min sob agitação e o gel descorado com uma solução de descoloração (metanol 30%, ácido acético 10%) até a visualização das bandas (Figura 10).

3.4.3 Digestão das proteínas em gel SDS-PAGE

Com o intuito de identificar proteínas da amostra, algumas bandas do gel de proteínas SDS-PAGE 15% foram cortadas manualmente e descoradas com 1 lavagem de 30 min com 25 mM de bicarbonato de amônio (AmBic) em 5% de acetonitrila (ACN) e duas lavagens de 20 min com 25 mM de AmBic em 50% de ACN (Figura 10). Em seguida, os pedaços de géis foram desidratados com 100% de ACN, reidratados com 20 mM de dithiothreitol (DTT) em 50 mM de AmBic e aquecidos a 60°C por 45 minutos. O sobrenadante foi removido e os pedaços de géis foram cobertos por uma solução de 55 mM de iodoacetamida (IAA) em 50 mM

de AmBic e incubados por meia hora à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi removido e os pedaços de géis foram lavados com 50 mM de AmBic por 1h. Os pedaços de géis foram novamente desidratados com 100% de ACN e reidratados com uma solução de 10 ng/μL de tripsina (Promega) em 50 mM de AmBic e incubados por 15 minutos no gelo para a completa reidratação e então o excesso de tripsina foi removido e adicionado 50 mM de AmBic até cobrir os pedaços de géis. O material foi incubado a 37°C por 14 h. Após a digestão, os pedaços de géis foram cobertos com 1% de ácido trifluoroacético (TFA) para a eluição dos peptídeos e incubados por 5 minutos com 50% de ACN. O material foi brevemente centrifugado, o sobrenadante transferido para um novo tubo e os pedaços de géis acrescidos de 100% de ACN. Os peptídeos obtidos nos vários sobrenadantes foram concentrados em speed vac (Savant SVC 100H Speed Vac Concentrator).

A dessalinização e concentração das amostras foram realizadas com a técnica do “*stage tip*” (RAPPSILBER *et al.*, 2003). Uma resina de C18 é ativada com 100% de ACN e equilibrada com 5% de ACN e 0,1% de TFA. Logo após as amostras são passadas duas vezes pela resina e lavadas com 5% de ACN e 0,1% de TFA. Em seguida os peptídeos são eluídos lentamente em 80% de ACN e 0,1% de TFA. As amostras foram concentradas em centrifuga com vácuo (Speed-vac).

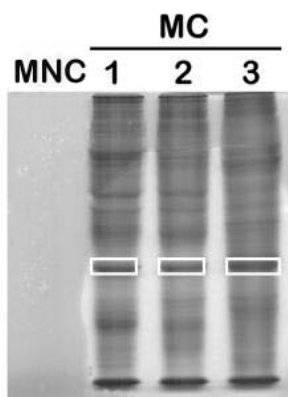


FIGURA 10 – GEL DE PROTEÍNA 15% UTILIZADO PARA A DIGESTÃO DE PROTEÍNAS DIRETAMENTE DO GEL.

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Os retângulos exemplificam as bandas que foram excisadas manualmente do gel. MNC: meio não condicionado; MC: meio condicionado; 1, 2, 3: triplicata biológica.

3.4.4 Preparação de amostras de proteínas para gel bidimensional (2-DE)

Aos MCs foram acrescentados inibidores de proteases (1 mM PMSF e 10 μ M TLCK) e as proteínas precipitadas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 95% de saturação. As proteínas precipitadas, conforme item 3.4.1, foram coletadas por 15 min de centrifugação a 10000 x g e ressuspensas em água ultra pura (18.2 M Ω). Para remover os sais, as amostras foram dialisadas por 30 h contra o tampão de focalização (7 M Urea, 2 M Thiurea, 40 mM Tris-HCl pH 8 e 10 mM DTT) usando um kit de diálise (mini-dyalisis kit-GE) com uma membrana com poros de 1KDa.

3.4.5 Eletroforese bidimensional (Gel 2-DE)

Antes da realização da primeira dimensão, ligações dissulfeto foram reduzidos com 10 mM de DTT (45 min à temperatura ambiente) e alquilados com 55 mM de iodoacetamida (IAA) e 10 mM de DTT (30 min em temperatura ambiente). A concentração de proteína foi determinada com kit 2D-Quant (GE Healthcare Amersham Biosciences, USA) e 150 μ g de proteínas foram solubilizadas em volume total de 100 μ l na solução de reidratação (8 M de uréia, 2% de CHAPS e 0,002% de azul de bromofenol 0,5% de IPG buffer pH 3-10 ou pH 4-7 (GE Healthcare) e 10% de isopropanol. As amostras foram aplicadas na fita de focalização (IPG strip 18 cm, pH 3-10 e pH 4-7, GE Healthcare) utilizando o sistema de “*cup load*” nas seguintes condições: 50 V- 1 h, 100 V-1 h, 300 V-1 h, 500 V-1 h, 1000 V-1 h, 2000 V-1 h, 4000 V-2 h e 6000 V-10 h. Antes da segunda dimensão, as fitas foram tratadas por 20 min com tampão de equilíbrio (6 M Uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8) acrescido de 2% de DTT, 20 min no mesmo tampão com 2,5% de IAA e em seguida foram colocadas na extremidade superior do gel de poliacrilamida 15%. A segunda separação eletroforética foi realizada a uma corrente elétrica de 8 mA até o corante atingir a extremidade inferior do gel. Os géis foram corados com prata de acordo com o método descrito por Blum *et al*, 1987. As proteínas foram fixadas por 30 minutos com solução de fixação (50% de etanol, 12% ácido acético), lavadas 3 vezes com solução de lavagem (50% de etanol) em diferentes tempos (5, 10 e 15 minutos), sensibilizadas por 30 segundos com a solução de sensibilização (0,02% de tiosulfato de sódio) e mais uma vez lavadas por três vezes de 20 segundos com água em abundância. Logo após as proteínas foram coradas com solução de prata

(0,2% de nitrato de prata e 0,75ml/L de formaldeído 37%) por 30 minutos e o excesso da solução removida com 3 lavagens de 30 segundos de água ultrapura. Os pedaços de géis com proteínas foram revelados com a solução de revelação (3% de carbonato de sódio, 0,0004% de tiosulfato de sódio e 0,5mL/L de formaldeído 37%). A revelação foi cessada com solução de 50% de etanol contendo 12% de ácido acético.

3.4.6 Digestão das proteínas provenientes de 2-DE

Spots de proteínas entre 10-50 kDa do gel bidimensional foram manualmente extraídos para a análise de espectrometria de massas. Os pedaços de géis foram descorados, as proteínas dos pedaços de géis reduzidas (20 mM DTT), alquiladas (55 mM IAA) e digeridas com uma solução de tripsina (10 ng/μl) em 50 mM de bicarbonato de amônio. Os peptídeos foram extraídos com uma solução de 50% de acetonitrila com 1% de TFA, concentrados em centrífuga à vácuo (Speed Vac) e ressuspensados em 1 μl de 0.1% de TFA para análise.

3.4.7 Análise dos peptídeos do meio condicionado por MALDI-TOF/TOF.

Os peptídeos foram analisados na UFPR – Departamento de Bioquímica – utilizando o sistema de ionização de peptídeos por laser associado à um método de separação desses íons pelo tempo de voo (MALDI – TOF/TOF) Bruker Daltonics.

Antes dos peptídeos serem analisados pelo equipamento eles foram misturados na proporção de 1:1 (v/v) com uma solução de cristalização (5 mg/ml de ácido 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic em 50% ACN, 0.1% TFA) e imediatamente aplicados em pequenos poços em uma placa de Maldi. As massas dos espectros foram obtidas em equipamento MALDI-TOF/TOF (Autoflex, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), operando em modo positivo. Foi utilizada a velocidade do laser a 33% e 50 tiros por cada disparo. Os arquivos foram salvos com 300-400 tiros por amostra.

Os arquivos obtidos em xml com a lista das massas foram gerados pelo software FlexAnalysis versão 2.0 (Bruker Daltonics) e as proteínas identificadas com o programa Mascot e banco de dados públicos (NCBI). A descrição da técnica

MALDI – TOF/TOF se encontra nos anexos (Anexo 1) e os parâmetros utilizados no Mascot constam na tabela 1.

Clivagens perdidas	Max 1
Modificação fixa	Carbamidomethyl (C)
Modificação variável	Oxidation (M)
Tolerância para peptídeos	50 ppm
Valores de massas	MH ⁺
Massa Experimental	Monoisotopic

TABELA 1 – PARÂMETROS USADOS NA BUSCA DE PROTEÍNAS PELO MASCOT.
FONTE: A autora (2009)

3.4.8 Análise das proteínas do meio condicionado por arranjos de anticorpos

Os MCs e os MNCs foram analisados com arranjo de anticorpos (RayBio™-Raybiotech) para fatores de crescimento e citocinas seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, as membranas foram bloqueadas por 30 min em uma solução contendo 5% de BSA, 0,01 M de Tris com 0,15M NaCl (pH7,6). Em seguida foram incubadas por 2h com 1mL de MC e MNC em temperatura ambiente. Após lavagem, as membranas foram incubadas por 15h com anticorpos anti-citocinas e anti-fatores de crescimento conjugados a biotina à 4°C. As membranas foram novamente lavadas e incubadas por 2h com estreptavidina conjugada com peroxidase em temperatura ambiente. Mais uma vez foram repetidas as etapas de lavagem e em seguida as membranas foram incubadas com 1ml de reagente de detecção (preparado com volumes iguais de buffer de detecção A e B) por 5-10 min. Em seguida, as membranas foram expostas ao filme Kodak x-omat (Kodak) para revelação dos spots (Figura 11). As análises de proteínas foram realizadas em três dos quatro MCs.

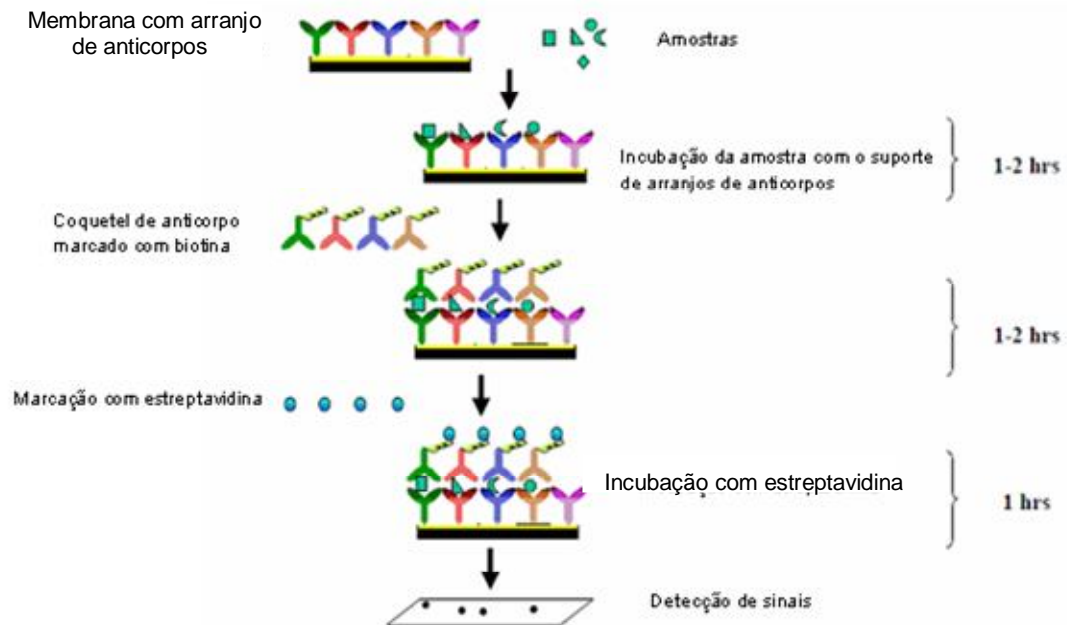


FIGURA 11 – MODELO ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA DE ARRANJO DE ANTICORPOS.
FONTE: RayBio™

Os sinais positivos das membranas significam que em determinada amostra existem aquelas proteínas conforme o mapa (Figura 12).

RayBio® Human Cytokine Antibody Array 1 Map

	a	b	c	d	e	f	g	h
1	Pos	Pos	Neg	Neg	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO-α
2	Pos	Pos	Neg	Neg	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO-α
3	IL-1α	IL-2	IL-3	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
4	IL-1α	IL-2	IL-3	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
5	IL-13	IL-15	IFN-γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MIG	RANTES
6	IL-13	IL-15	IFN-γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MIG	RANTES
7	TGF-β1	TNF-α	TNF-β	Blank	Blank	Blank	Blank	Pos
8	TGF-β1	TNF-α	TNF-β	Blank	Blank	Blank	Blank	Pos

RayBio® Human Growth Factor Antibody Array 1 Map

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	POS	POS	NEG	NEG	AR	bFGF	b-NGF	EGF	EGF R	FGF-4	FGF-6	FGF-7
2	POS	POS	NEG	NEG	AR	bFGF	b-NGF	EGF	EGF R	FGF-4	FGF-6	FGF-7
3	GCSF	GDNF	GM-CSF	HB-EGF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-6	IGF-I	IGF-I SR
4	GCSF	GDNF	GM-CSF	HB-EGF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-6	IGF-I	IGF-I SR
5	IGF-II	M-CSF	M-CSF R	NT-3	NT-4	PDGF R α	PDGF R β	PDGF-AA	PDGF-AB	PDGF-BB	PIGF	SCF
6	IGF-II	M-CSF	M-CSF R	NT-3	NT-4	PDGF R α	PDGF R β	PDGF-AA	PDGF-AB	PDGF-BB	PIGF	SCF
7	SCF R	TGF-α	TGF-β	TGF-β 2	TGF-β 3	VEGF	VEGF R2	VEGF R3	VEGF-D	BLANK	BLANK	POS
8	SCF R	TGF-α	TGF-β	TGF-β 2	TGF-β 3	VEGF	VEGF R2	VEGF R3	VEGF-D	BLANK	BLANK	POS

FIGURA 12 – MAPA DOS ARRANJOS DE ANTICORPOS DAS CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO.
FONTE: RayBio™

Para a análise e normalização dos resultados, as membranas possuem *spots* correspondentes a controles positivos, controles negativos e *spots* “vazios” para determinar os valores de *background*.

Os filmes foram escaneados e as imagens em TIFF foram copiadas para um *software* (ScanAnalyze versão 2,5- www.graphics.stanford.edu/software/scanalyze) que mede a intensidade dos spots (Figura 13).

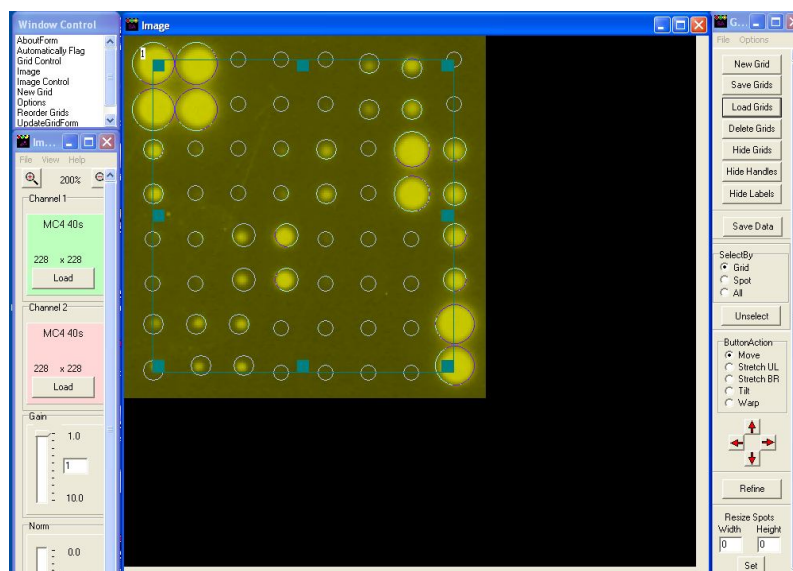


FIGURA 13 – SOFTWARE QUE MEDE A INTENSIDADE DOS SPOST DAS MEMBRANAS
FONTE: RayBio™

Os valores das intensidades dos *spots* foram importados do ScanAnalyze para o *software* de análise fornecido pelo próprio fabricante dos arranjos (Raybio® Analyzis Tool software) (Figura 14).

Sample	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	28921	29105	28714	29896	4897	4552	4840	4881	5454	5451	5497	5560	5609	5453		
2	4547	4752	4829	4847	4500	4505	4850	4851	5320	5286	5378	5387	5322	5652		
3	4447	4520	4832	4371	4525	4659	4728	4873	5019	5165	5282	5037	5265	5434		
4	4513	4526	4896	4268	4496	4595	4708	5007	5009	5100	5326	4880	4913	5340		
5	4569	4541	4344	4282	4333	4617	6709	5992	5007	5197	5319	4746	5074	5175		
6	4833	4532	4396	4309	4329	4671	6864	6106	4940	5039	5227	4741	5281	5257		
7	5407	5015	5134	4426	4354	4069	5135	5478	5469	5397	5548	5154	5813	5920		
8	6126	5837	5313	4608	4777	5013	5576	5951	5808	5755	5738	5345	6070	6189		
9	6468	6917	6516	5337	5362	5529	6250	6269	6255	5547	5311	5411	6099	6384		
10	6129	6716	6044	5192	5299	5403	5892	6180	6219	5587	5502	6462	30950	20041		

FIGURA 14 – IMPORTAÇÃO DOS DADOS PARA O RAYBIO® ANALYZIS TOOL SOFTWARE
FONTE: RayBio™

Os dados são alinhados de acordo com o mapa da figura 15, e os cálculos realizados pelo *software* consistem em subtrair os valores de *backgrounds* e calcular em relação à média do controle positivo (Figura 15).

Sample	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	Background
1	28921	29105	28714	29896	4897	4552	4840	4881	5454	5451	5497	5560	5609	5453	4447
2	4547	4752	4829	4847	4500	4505	4850	4851	5320	5286	5378	5387	5322	5652	4520
3	4447	4520	4832	4371	4525	4659	4728	4873	5019	5165	5282	5037	5266	5434	4832
4	4513	4526	4896	4268	4496	4595	4708	5007	5009	5100	5326	4880	4913	5340	4371
5	4569	4541	4344	4282	4333	4617	6709	5992	5007	5197	5319	4746	5074	5175	
6	4833	4532	4396	4309	4329	4671	6864	6106	4940	5039	5227	4741	5281	5257	
7	5407	5015	5134	4426	4354	4069	5135	5478	5469	5397	5548	5154	5813	5920	
8	6126	5837	5313	4608	4777	5013	5576	5951	5808	5755	5738	5345	6070	6189	
9	6468	6917	6516	5337	5362	5529	6250	6269	6255	5547	5311	5411	6099	6384	
10	6129	6716	6044	5192	5299	5403	5892	6180	6219	5587	5502	6462	30950	20041	

FIGURA 15 – ALINHAMENTO DOS DADOS
FONTE: RayBio™

Para a análise estatística os valores gerados pelo software tiveram os valores de *backgrounds* subtraídos e foram calculados em relação à média do controle positivo (Figura 16).

	CT_5S			CT_40S			MC1_5S			MC2_5S			MC3_5S		
	1	2	AVERAGE	1	2	AVERAGE	1	2	AVERAGE	1	2	AVERAGE	1	2	AVERAGE
POS			55.240			41.332			67.203			58.086			48.225
NEG			1.807			21.272			770			1.891			4.825
G-CSF	2.179	2.159	2.169	21.292	21.581	21.427	1.125	773	949	1.252	2.734	1.993			
GM-CSF	2.625	32.452	32.539	25.807	25.521	25.664	28.088	29.453	28.771	39.869	35.943	37.906			41.432
GFO	33.858	470	17.164	29.836	29.419	29.628	50.517	45.851	48.184	41.998	39.490	40.744			53.800
GFO-alpha	4.322	5.980	5.151	21.436	21.616	21.526	5.959	8.373	7.166	14.371	14.462	14.417			38.777
IL-1alpha	46.800	41.197	43.994	32.440	25.504	28.972	36.766	31.134	33.950	42.160	38.882	40.521			44.731
IL-2	1.987	1.003	1.495	22.956	21.366	22.161	2.708	1.597	2.153	3.579	4.045	3.812			4.623
IL-3	1.892	422	1.152	21.542	21.888	21.715	1.05	38	87	1.201	360	796			918
IL-5	2.317	7.953	5.135	23.363	23.081	23.222	7.352	8.455	7.904	10.805	17.201	17.653			18.518
IL-6	2.377	2.650	2.514	23.449	22.377	22.913	42.798	40.540	41.669	12.703	12.397	12.550			58.601
IL-7	4.753	3.467	4.110	21.635	21.625	21.630	132	1.165	649	1.751	3.121	2.436			39.265
IL-8	42.559	43.715	43.137	32.050	30.938	31.494	55.241	53.389	54.315	48.631	49.534	49.083			64.316
IL-10	45.191	49.620	47.406	34.737	35.202	34.970	44.079	43.260	43.670	1.014	43.907	22.461			53.402
IL-13	1.475	1.345	1.410	21.536	21.273	21.405	1.288	1.437	1.363	3.347	3.293	3.320			2.972
IL-15	4.356	2.134	3.275	21.609	21.628	21.619	2.899	2.165	2.532	9.102	7.686	8.394			9.424
IFN-gamma	20.208	14.525	17.367	25.175	25.344	25.260	20.549	16.965	18.757	27.039	23.261	28.150			40.081
MCP-1	24.522	24.804	24.663	25.355	25.867	25.611	52.184	50.894	51.539	56.239	56.524	56.382			59.760
MCP-2	4.500	5.508	5.004	21.657	21.584	21.621	2.898	2.453	2.571	9.181	11.893	11.537			10.150
MCP-3	1.533	1.242	1.388	21.532	21.408	21.470	3	491	242	2.751	2.459	2.605			6.781
MIG	6.439	6.367	6.703	22.144	21.811	21.978	3.811	4.427	4.119	8.700	6.538	7.619			8.605
RANTES	48.101	49.198	48.655	39.082	38.147	38.615	47.961	48.756	48.359	44.647	47.544	46.096			48.530
TGF-beta 1	50.141	35.512	42.827	22.361	22.675	22.518	38.443	38.259	38.351	43.586	43.599	43.593			38.808
TNF-alpha	6.758	11.683	14.221	23.809	23.409	23.609	13.006	12.313	12.660	20.796	19.770	20.283			0
TNF-beta	28.098	25.522	27.310	25.618	25.239	25.429	24.149	22.938	23.544	32.139	30.462	31.301			37.734
Background			85			21.495			42			209			

FIGURA 16 – DADOS FINAIS GERADOS PELO SOFTWARE

FONTE: A autora (2009)

NOTA: Os valores de intensidade dos *spots* (circulados em vermelho) tiveram os valores de *backgrounds* subtraídos e foram calculados em relação à média dos valores do controle positivo (circulados em roxo).

Os valores normalizados foram copiados para o software estatístico GraphPad Prism 5. Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média e comparações entre os grupos foram feitos por ANOVA de duas vias (two-way ANOVA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.5 Local de coleta de material para isolamento das células-tronco mesenquimais (CTMs)

As Células-tronco da medula óssea foram obtidas de pacientes portadores de cardiomiopatia dilatada que participaram do “Estudo Multicêntrico Randomizado de Terapia Celular e Cardiomiopatias” realizado na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia – Curitiba/PR. Este estudo tem a liberação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP – registro 11259) e o uso dessas células em nosso trabalho tem a aprovação do comitê de ética da FIOCRUZ.

3.6 Isolamento e cultura de CTMs

As células-tronco adultas utilizadas nesse trabalho foram fornecidas pelo grupo do Laboratório de Cultivo Celular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Cerca de 5-10 mL de medula óssea (MO) de cada doador foram utilizados para o estudo. A coleta de MO foi realizada por meio da punção ilíaca posterior dos doadores, com auxílio de seringas contendo solução anti-coagulante (heparina sódica) e transferida para tubos cônicos contendo meio RPMI diluído na proporção de 1 volume de MO: 1 volume de meio RPMI.

O isolamento das células mononucleares da MO foi realizado segundo o método descrito por Böyum (1968). O material foi colocado sobre uma solução de Ficoll-Hypaque ($d = 1,077 \text{ g/cm}^3$) (Sigma Chemical, St. Louis, USA) e centrifugado a $400 \times g$ por 30 minutos. Em seguida, o anel de células mononucleares, que fica na interface entre o plasma e o ficoll, foi retirado e passado para um tubo cônico. Este material foi lavado duas vezes com meio de cultura RPMI em seguida as células foram contadas e plaqueadas numa densidade de 1×10^5 células por cm^2 em frascos de cultura de 75 cm^2 e cultivadas em meio IMDM suplementado com 15% de soro fetal bovino (SBF) (GIBCO™ Invitrogen, NY, USA), $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. Os frascos foram incubados em estufa umidificada a 37°C com 5% de tensão de CO_2 . O meio dos cultivos foram trocados duas vezes por semana até as células alcançarem a confluência celular. Quando confluentes, as células aderentes foram dissociadas utilizando tripsina – EDTA a 0,25% e novamente plaqueadas numa concentração de $1,3 \times 10^4$ células por cm^2 (primeira passagem).

Para certificar de que as células isoladas eram de fato CTMs, as populações de células morfológicamente homogêneas foram imunofenotipadas na 2-5 passagem segundo o método do Morbidity and Mortality Weekly Report e pela equipe da PUC-PR os seguintes marcadores de membrana foram analisados: anti-CD 105 (SH2), CD 166, CD 29, CD 14, CD 34, CD 45, CD 73 (SH4), CD 31, CD 117, anti-vimentina (BD Biosciences, Oxford, UK), CD 90. A análise por citometria de fluxo foi realizada pelo FACS Calibur (BD Biosciences).

3.7 Cultivo das CTMs com MC

Para o cultivo com MC foram utilizadas três amostras congeladas de CTMs de medula óssea de diferentes doadores e cultivadas até seu uso com meio de cultivo celular IMDM suplementado com 15% de SFB e 1 ml/L de antibiótico penicilina (100 µg/mL)-estreptomicina (100 U/mL). As CTMs entre as passagens 3-5 foram dissociadas da garrafa de cultivo com tripsina, contadas e 8×10^4 células por cm^2 foram plaqueadas em placas de cultivo de seis poços (TPP, Trasadigen, Switzerland), no qual quatro poços foram utilizados para extração de RNA e dois para contagem de células. Para os estudos de imunofluorescência indireta 4×10^4 células por cm^2 foram plaqueadas em placa de vinte quatro poços (TPP, Trasadigen, Switzerland) (Figura 17). Em ambos os procedimentos as CTMs foram mantidas em meio IMDM suplementado com 15% de SFB e 1 ml/L de antibiótico penicilina (100 µg/mL)-estreptomicina (100 U/mL) até atingirem a confluência desejada.

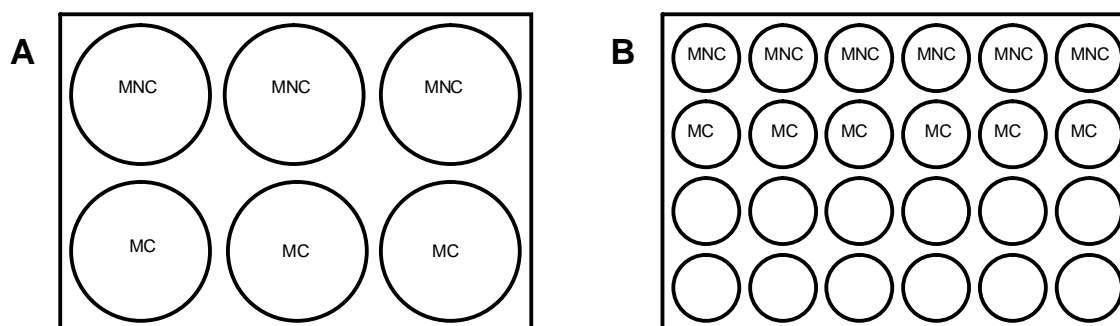


FIGURA 17 – MAPA DOS CULTIVOS DE CÉLULAS

FONTE: A autora (2008)

NOTA: A. Placa de cultivo de seis poços utilizados para extração de RNA e contagem de células; B. Placa de cultivo quatro poços utilizadas para imunofluorescência indireta. CT: controle; MC: meio condicionado

Logo que as células atingiram uma confluência de 80% as CTMs foram cultivadas com 1mL por poço (na placa de 6 poços) e 500 µL por poço (na placa de 24 poços) da mistura dos MCs suplementados com 5% de SFB, 1 ml/L de antibiótico penicilina (100 µg/mL)-estreptomicina (100 U/mL) e incubadas na estufa com 5% de tensão de CO_2 a 37°C com troca do meio condicionado a cada dois dias. Para controle as CTMs foram tratadas com IMDM suplementado com 5% de SFB e 1 ml/L de antibiótico penicilina-estreptomicina.

O cultivo foi realizado por 6 e 21 dias, sendo que a cada dois dias durante os 21 dias de cultivo, o efeito do MC nas CTMs foi observado e fotografada através do microscópio Nikon Eclipse E600 com aumentos de 10x, 20x, 40x. As imagens digitais foram capturadas através da câmera CoolSnap (Media Cybernetics) e ajustadas com o programa Image Pro-Plus v.4.5.1.22 (Media Cybernetics).

3.8 Avaliação da viabilidade das CTMs cultivadas com MCs

Para a avaliação da sobrevivência, as CTMs foram dissociadas das placas de cultivo pela adição de tripsina (0,05% p/v)-EDTA (0,02% p/v) e incubadas na estufa com 5% de tensão de CO₂ a 37°C por 30 min. Em seguida as células desaderidas da placa de cultivo foram coletadas, centrifugadas por 10 segundos para a formação do *pellet* e o *pellet* diluído em 200 µL de meio IMDM. Logo após as amostras diluídas eram coradas com azul de tripan na proporção de 1:1 (v/v) e então contadas na Câmara de Neubauer.

Todos os valores foram arquivados no software Excel e os gráficos foram gerados como razão do número total de células de MC pelo número total de células de CT \pm erro padrão da razão.

3.9 Extração de RNA total

A extração do RNA total das culturas de CTMs tratadas com MC ou com MNC foram realizadas com o kit RNeasy (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras foram primeiramente lisadas com o tampão RLT acrescido de β -mercaptoetanol diluídas na diluição de 1:100 e tratadas com etanol 70%. Em seguida esse lisado foi aplicado em colunas de centrifugação contendo uma membrana de sílica (RNeasy Mini spin column) e centrifugado por 15 segundos à 8000 x g. Logo após a amostra foi lavada com um tampão de lavagem por 15 segundos à 8000 x g e tratadas com DNase I (QIAGEN) por 15 minutos à 30°C. AS colunas foram lavadas para remover os contaminantes presentes na amostra, e logo após foi concentrada e eluída em água. As concentrações do RNA foram determinadas por espectrofotometria (Nanodrop-Spectrophotometer ND-100-UNISCIENCE) e amostra foi armazenada a -70°C.

3.10 Síntese de cDNA pela transcriptase reversa

A síntese do DNA complementar (cDNA) seguiu com a concentração do RNA em Microcon 30 (Milipore) a partir de 1 µg de RNA total usando 1 µL de 10 mM de iniciadores oligo dT (USB Corporation) e 9,4 µL da mistura de reagentes descrito na tabela 2. Em seguida foram incubados à 42°C por duas horas.

Mistura de reagentes	
Concentração do estoque	Concentração final
Buffer ImProm II (Promega) 5x	1x
MgCl ₂ 2,5mM	1,5 mM
dNTPs 10mM	0,5 mM
RNase Out (Promega) 40U/µL	2 U
Transcriptase Reversa (Promega) 100U	1 U

TABELA 2 – LISTA DE REAGENTES UTILIZADOS PARA A SÍNTESE DE CDNA
FONTE: A autora (2009)

Após a incubação 2 U de RNase H (Promega) foram adicionadas e as incubações feitas por mais 30 min à 37°C. A purificação do cDNA seguiu com a adição de 400 µL de água e a concentração em Microcon por 7 minutos à 12000 x g. O volume final foi completado para 300 µL e o cDNA foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop-Spectrophotometer ND-100-UNISCIENCE) e diluído para uma concentração de 2 ng/µL (solução de uso).

3.11 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com 20-50 ng de cDNA, 20 mM tris HCL (pH 8,4), 50mM KCL, 10 pmol de iniciadores, 5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTPs e 0,6 U de taq polimerase (InvitrogenTM, NY, USA). Os valores dos reagentes apresentados são acima, são valores do volume final da reação.

Os oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho foram desenhados com o auxílio do *software* PrimerSelect (DNASar versão 5,03[©]) através das seqüências de

genes humanos disponíveis no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências dos iniciadores estão listadas na tabela 2.

A PCR foi realizada em termociclador (Termociclador Biocycler MyGene™ – Series Peltier Thermal Cyclers, Perkin Elmer 9700 ou MWG Biotech) nas seguintes condições: 94°C – 2 minutos; 30 ciclos de 94°C – 15 segundos; a temperatura e o tempo de anelamento do iniciador ao cDNA variou de acordo com cada iniciador, conforme a tabela 3; 72°C – 40 segundos e 72°C – 3 minutos.

Gene	Sequência (5'-3')	Número de acesso	Amplicon (pb)	TM (°C)	Tempo (seg)
GAPDH	F: GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC R: TGGTTACACCCATGACGA	NM 2597	150	55	30
Cx43	F: CCTTCTTGCTGATCCAGTGGTAC R: ACCAAGGACACCACCAGCAT	NM 65188	154	62	30
cTnI	F: GGGGGCCCCGGGCTAAGGAGTC3 R: AGGGCAGGGGCAGTAGGCAGGAAG	NM 000363.4	183	60	30
cTnT	F: AGGAGAAGTTCAAGCAGCAGA R: GCGAGCGAGGAGCAGAT	NM 000364.2	155	55	30
Nkx2.5	F: GGTCTATGAACTGGAGCGGC R: ATAGGCGGGGTAGGCGTTAT	NM004387.2	322	60	30
VEGF	F: CTACCTCCACCATGCCAAGTG R: TGCCTGATAGACATCCATGA	M27281	101	60	30

TABELA 3 – PRIMERS UTILIZADOS PARA RT-PCR

FONTE: A autora (2009)

NOTA: Abreviações: Cx43: conexina 43; cTnI: troponina I; cTnT: troponina T; Nkx2.5: fator transcricional relacionado ao locus 5; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

3.12 Eletroforese de DNA

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. Foram aplicados 20µL da reação de RT-PCR, visualizados pela marcação com brometo de etídeo (0,2 mg/L) e fotografado sobre a luz ultra violeta (UV White Darkroom, UVP Biomaging Systems).

3.13 RT-qPCR

A análise quantitativa dos transcritos dos genes de interesse foi realizada através da PCR em tempo real. Os qPCRs foram realizados no aparelho ABI PRISM 7000® *Sequence Detection System* (Applied Biosystem). As amostras foram ensaiadas em volume de 20 µL de reação, contendo 20 ng do cDNA e 15 µL de *SYBR Green Máster Mix* (Applied Biosystems®) com 5 pmoles de iniciadores, conforme as instruções do fabricante. Os ciclos da PCR consistiram de 95°C por 10 minutos; 45 ciclos de 95°C por 15 segundos; 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; seguido de uma etapa adicional que corresponde a etapa que analisa a dissociação: 95°C por 15 segundos; 60°C por 1 minuto; 95°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos.

Para cada par de iniciadores utilizados foi necessário uma curva de diluições seriadas de amostras conhecidas. Os dados das reações com a curva fornecem valores com tendências de acordo com a diluição e com esses valores foi possível obter uma quantidade relativa à cada ciclo de amplificação. Todas as amostras foram feitas em triplicatas.

Quanto à análise dos dados, a média dos valores relativos de expressão de conexina-43 e VEGF, por exemplo, foi dividida pela média dos valores relativos da expressão de GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). Desta forma, as amostras diferentes são normalizadas de acordo com o gene constitutivo (gene normalizador). A curva de dissociação foi utilizada para verificar a especificidade do produto.

A análise estatística realizada considerou o desvio padrão relativo entre as triplicatas dos dados dos genes em estudo com o gene normalizador. Para isso, o coeficiente de variação (cv) é dado pela fórmula:

$$Cv = \left[\frac{\text{DesvPad}}{\text{MédiaQnt}} \right]^2 + \left[\frac{\text{Desv PadGAPDH}}{\text{MédiaQntGAPDH}} \right]^2$$

Onde: DesvPad: Desvio padrão das médias das quantidades relativas do gene; Média Qnt: Média das quantidades relativas do gene; DesvPadGAPDH: Desvio

padrão das médias das quantidades relativas do GAPDH; e Média QntGAPDH: Média das quantidades relativas de GAPDH.

3.14 Imunofluorescência indireta (IFI)

CTMs cultivadas com MNC e MC foram lavadas três vezes com PBS e fixadas por 5 min com paraformaldeído 4% (PFA). Após as células foram permeabilizadas em solução de PBS contendo 0,5% de triton X-100 por 30 min e bloqueadas com 5% de SFB (PBS-BSA) por 60 min. As amostras bloqueadas foram incubadas por 1h à 37°C com anticorpos policlonais anti-troponina I cardíaca humana, anti-troponina T cardíaca humana (Santa Cruz Biotechnology, inc), anti- α -actinina cardíaca humana, diluídos 1:200 e anti-conexina-43 humana (Becton ,Dickison and Company), diluído 1:10 por 1 h à 37°C. Todos os anticorpos foram diluídos em solução de PBS-BSA. Em seguida as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas por 30 min com Alexa 488-conjugado com anticorpo anti cabra IgG (Invitrogen) diluído 1:400 ou Alexa 456-conjugado com anticorpo anti camundongo IgG (Invitrogen) diluído 1:400 por 1 h à 37°C. Novamente elas foram lavadas 3 vezes com PBS e logo após os núcleos foram marcados com 4',6-diamidine-2'phenylindole (DAPI 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) por 5min a temperatura ambiente. O excesso de DAPI foi retirado com 3 lavagens de PBS e as lâminulas foram fixadas em lâminas com n-propil-galato (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As amostras foram fotografadas usando um microscópio de epifluorescência óptica Nikon E-600, as imagens digitais foram capturadas através da câmera CoolSnap (Media Cybernetics) e ajustadas com o programa Image Pro-Plus v.4.5.1.22 (Media Cybernetics).

3.15 Análise semi-quantitativa das amostras de imunofluorescência

A porcentagem das células positivas para troponina I e troponina T cardíacas foi calculada através da fotografia em aumento de 20x e da contagem de células imuno-positivas e células totais em 10 campos aleatórios, usando o software Image J (www.rsweb.nih.gov/ij). Foram contados aproximadamente 100 células por campo resultando num total de 10000 células para cada condição. Todos os valores foram arquivados no software Excel e para as análises semi-quantitativas os valores foram

expressos pela razão das porcentagens de célula imunopositivas na cultura de, MC pela porcentagem de células do CT \pm erro padrão da razão.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação dos fatores solúveis presentes no meio condicionado.

4.1.1 Identificação das proteínas do sobrenadante da cultura de explantes cardíacos humanos utilizando espectrometria de massas e arranjos de anticorpos

Para a obtenção do meio condicionado foram usadas um total de 4,8 mg de explantes cardíacos humanos distribuídos em quatro garrafas de 75cm² com 20 mL de meio IMDM sem soro em cada uma. No total foram obtidos 60 mL de meio condicionado de cada amostra para serem utilizados na análise proteômica e nos cultivos das CTMs.

Sabendo que ácidos nucleicos podem interagir com proteínas e atrapalhar a identificação destas por espectrometria de massas, os MCs foram quantificados para avaliar a presença dos ácidos nucleicos nas amostras (figura 18 A). A concentração de ácidos nucleicos no MC foi de: 18,5 ng/μL em MC1, 5,8 ng/μL em MC2 e -0,8 ng/μL em MC3 confirmando a presença de ácidos nucleicos nos MCs. 20 μL de cada MC foram aplicados em gel de agarose 2% (figura 18 B) comprovando os dados de quantificação.

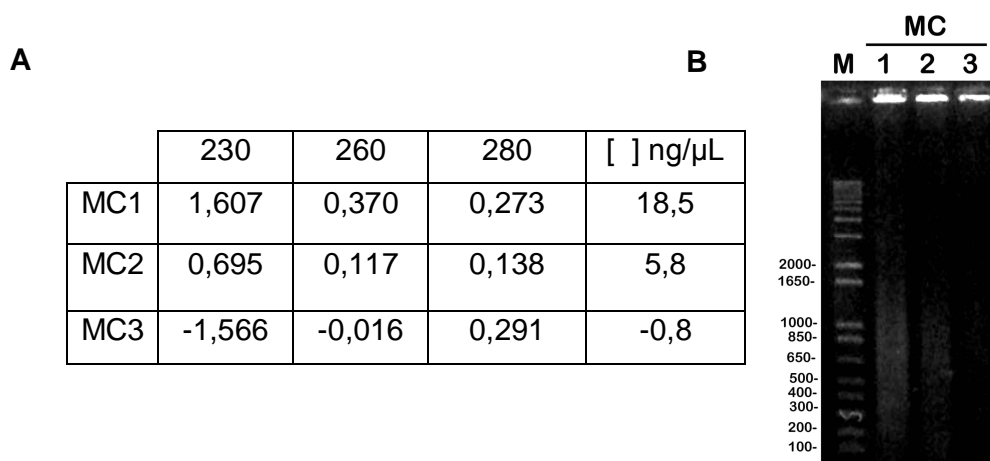


FIGURA 18 – CONTEÚDO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS NAS AMOSTRAS DE MEIO CONDICIONADO DE TRIPLICATA DE EXPLANTES CARDÍACOS.

FONTE: A autora (2009)

NOTA: Abreviações: M; marcador de peso molecular, MC1-3; triplicata biológica do MC.

Com o intuito de determinar a qualidade e a complexidade das proteínas presentes na amostra, estas foram analisadas por SDS-PAGE 15% e coradas com

Comassie-Blue. As amostras de proteínas presentes no MC são altamente complexas. Essas proteínas são de variados tamanhos, desde pequenos peptídeos até proteínas com altos pesos moleculares. Além disso, é possível observar que há uma grande quantidade de proteínas presente no MC e como esperado, não foram observadas proteínas no MNC. Ainda, quando analisamos os três meios verificamos que perfis de proteínas são muito similares com pequenas diferenças entre os diferentes doadores (ver setas na Figura 19).

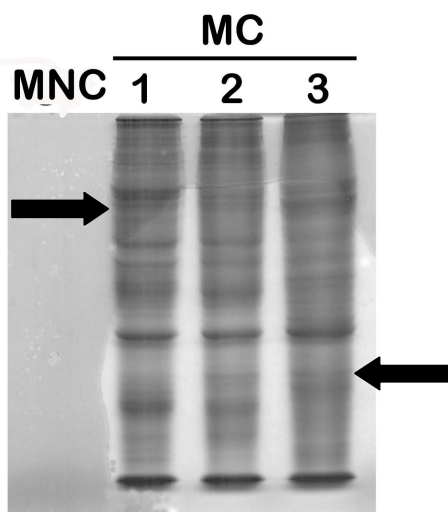


FIGURA 19 – PERFIL DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM MC1-3

FONTE: A autora (2009)

NOTA: As bandas apontadas com flechas em preto mostram proteínas que estão presentes em apenas um dos meios. Abreviações: MNC: meio não condicionado, MC1-3: triplicata biológica de MC

O perfil de expressão das proteínas, visualizado por SDS-PAGE, serviu para avaliar a grande quantidade de proteínas liberadas pelos explantes cardíacos ao meio de cultivo.

Com o intuito de identificar algumas proteínas e de diminuir a complexidade das amostras, algumas bandas do gel de proteínas SDS-PAGE 15% foram extraídas para análise em MALDI-TOF/TOF, no entanto não foi possível identificar nenhuma proteína ou devido a perda de material durante as etapas de lavagem, ou por causa da baixa liberação desses fatores pelos explantes cardíacos.

Para uma melhor visualização, resolução, separação e identificação do proteoma celular foram realizados géis 2-DE seguido da espectrometria de massas. Como objetivo dessa abordagem foi identificar algumas proteínas abundantes no MC, apenas um dos quatro meios foi tratado para concentração e identificação das proteínas.

Antes do resultado final, que gerou a melhor visualização do proteoma em gel 2-DE, vários testes para aumentar o rendimento da amostra e melhorar a separação de proteínas em gel, foram testados. Os resultados destes testes são mostrados na sessão de Anexos (Anexo 3).

As proteínas concentradas e purificadas foram separadas com espectros de pH 3-10 e 4-7. Em gel de pH 3-10 houve uma separação razoável das proteínas, no entanto acima de 50 kDa ainda havia uma grande quantidade que não foram separadas, deixando um rastro no gel, devido a ampla faixa de pH que impede uma definição mais precisa do ponto isoelétrico das proteínas, acumulando todas muito próximas (Figura 20). Mesmo assim alguns *spots* foram extraídos e tripsinizados para análise por MALDI/TOF-TOF (Tabela 3).

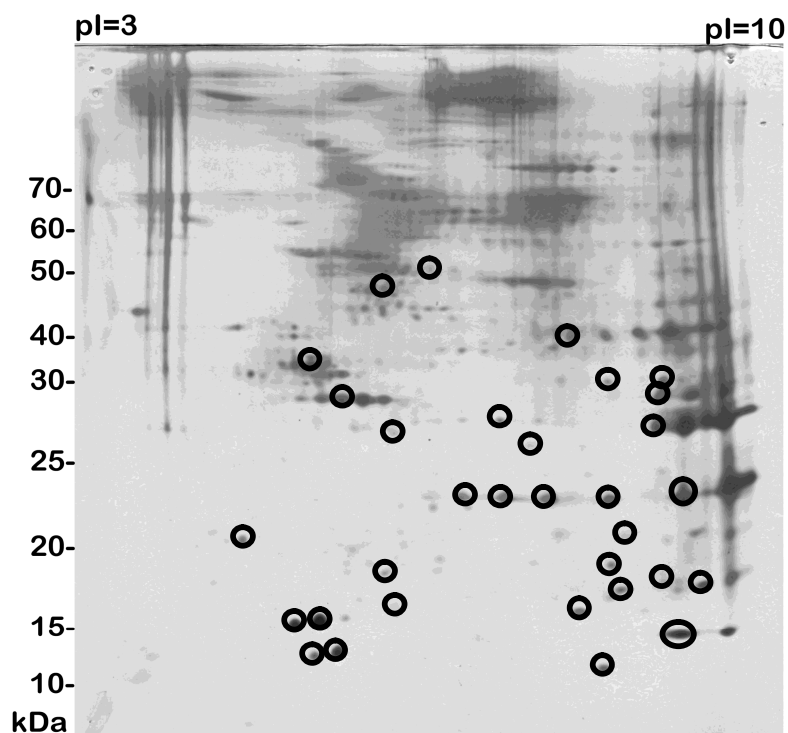


FIGURA 20 – GEL 2-DE COM PONTOS ISOELÉTRICOS DE pH 3-10

FONTE: A autora (2009)

NOTA: Os spots circulados correspondem aos spots que foram retirados manualmente do gel para tripsinização dos peptídeos.

A separação isoelétrica de pH 4-7 foi mais eficiente em delinear essas proteínas que não estavam resolvidas em gel de pH 3-10. Com o pH 4-7, foi possível observar uma grande quantidade de proteínas, muitas apresentando isoformas. Estes géis comprovaram a alta complexidade das amostras com proteínas muito

abundantes e alguns *spots* com baixa intensidade de marcação o que está relacionado com a baixa abundância dessas proteínas no MC (Figura 21).

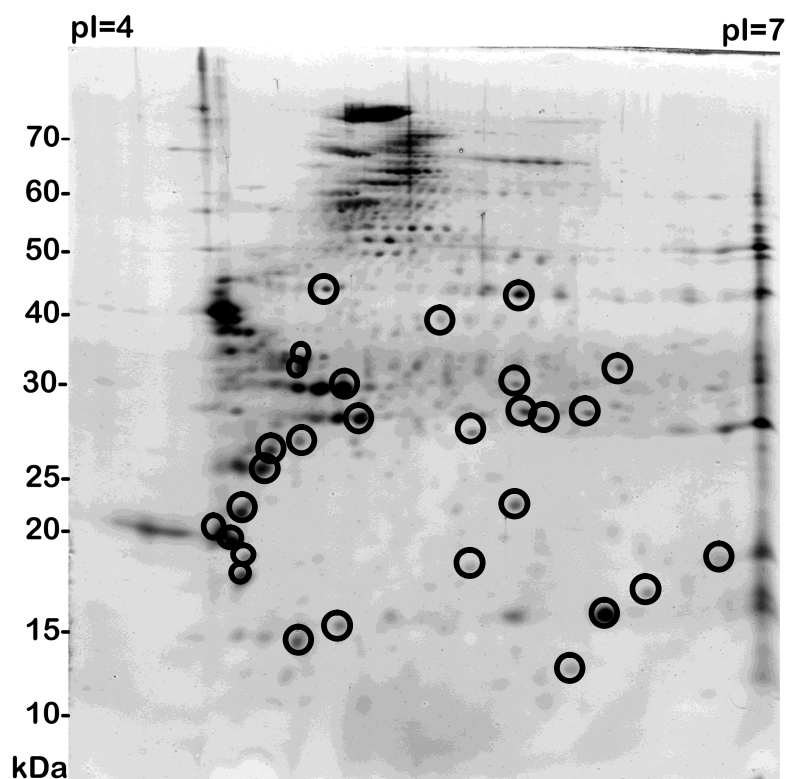


FIGURA 21 – GEL 2-DE COM PONTOS ISOELÉTRICOS DE pH 4-7

FONTE: A autora (2009)

NOTA: Os spots circulado correspondem aos spots que foram retirados manualmente do gel para tripsinização dos peptídeos.

Para a identificação dessas proteínas, aproximadamente 30 *spots* de cada gel foram retirados manualmente, na faixa de 10-50 kDa onde a definição e separação dos *spots* foi alta. Para a escolha dos *spots* não foram utilizados nenhum parâmetro como, por exemplo: tamanho dos *spots*, ponto isoelétrico entre outros.

Das 60 proteínas retiradas dos géis, 20 foram identificadas, sendo que 10, que estão listadas na tabela 3, foram consideradas significativas com valor de $EV \leq 10^{-3}$, podendo afirmar que a identificação dessas proteínas é confiável. As outras 10 com valor de $EV \geq 10^{-3}$ não permitem afirmar com confiabilidade que de fato esses peptídeos correspondem a essas proteínas. As 10 proteínas consideradas significativas possuem funções variadas e vão desde proteínas estruturais como a alfa actinina a metabólicas como a malato desidrogenase1 (Tabela 3). A forma em que o valor de EV é alcançado está explicada no anexo I.

Proteína	EV	gene ID
TPI1 triosefosfato isomerase 1	5,60E-13	7167
ACTN3 alfa actinina 3	3,50E-08	89
MDH1 malato dehydrogenase 1	8,00E-05	4190
DCI dodecenoyl-Coenzyme A delta isomerase	3,80E-04	1632
MyBPC Proteína C Cardíaca com ligação na miosina	4,20E-04	4607
ACTA2 alfa actina 2 do músculo cardíaco da aorta	5,50E-05	59
SOD2 superóxido dismutase 2, mitocondrial	5,70E-04	6648
ACTC1 alfa actina cardíaco 1 do músculo	1,00E-03	70
MYL4 cadeia leve da miosina 4	4,00E-03	4635
MYLK quinase da cadeia leve da miosina	5,90E-03	4638

TABELA 4 - TABELA DE DADOS GERADOS PELO PROGRAMA MASCOT.

FONTE: A autora (2009)

NOTA: Proteínas com valores $EV < 10^{-3}$ foram consideradas significativas. A tabela mostra os resultados das proteínas identificadas tanto em gel de pH 3-10 como de 4-7.

Com o intuito de identificar moléculas indutoras de crescimento e diferenciação celular foram usados arranjos de anticorpos para avaliar a presença de citocinas e fatores de crescimento nos MCs que poderiam ser liberados pelos explantes cardíacos.

Avaliando visualmente as membranas dos arranjos de anticorpos é possível observar que há um perfil de expressão diferenciada na intensidade dos *spots* entre MNC e MC (Figura 22). É importante salientar que as membranas do controle foram tratadas apenas com meio IMDM sem soro fetal bovino e os *spots* positivos que elas apresentam, são os controles positivos. As intensidades de fluorescência que apresentaram valores de $p < 0,05$ nas membranas de MC variaram de 1,5 até 12 vezes quando comparadas com a intensidade do *spot* das membranas do MNC. Por exemplo, IL-6 apresenta intensidade dos *spots* em torno de 10 vezes maior nas membranas de MC que os seus níveis no MNC. Enquanto que IL-8 apresenta um aumento de 1,5 em sua intensidade mesmo apresentando um valor estatístico significativo ($p < 0,05$). Estas diferenças se tornam muito evidentes quando comparamos as membranas expostas por 40 segundos ao filme. A reprodutibilidade foi alta entre as replicatas biológicas do MC analisadas.

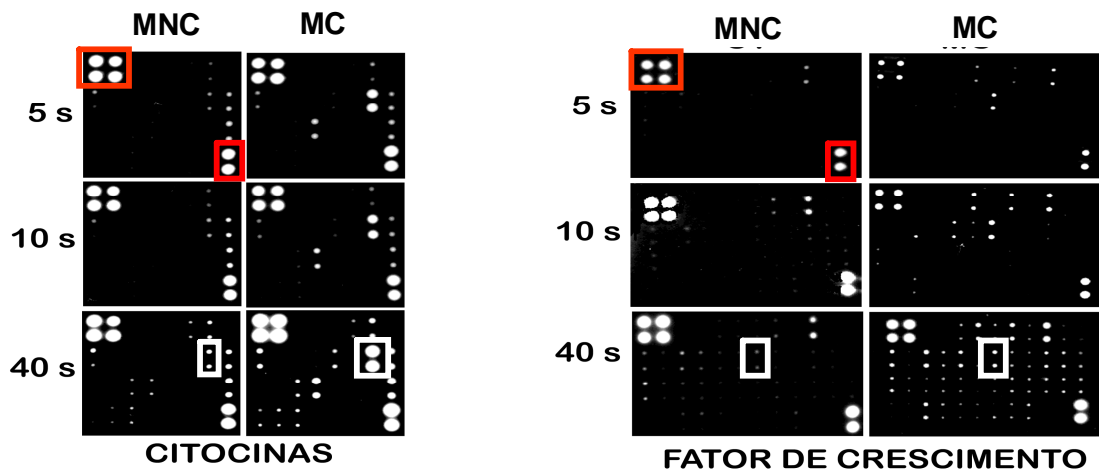


FIGURA 22 – CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO PRESENTES NO MEIO CONDICIONADO.

FONTE: A autora (2009)

NOTA: Os spots circulados em branco mostram a diferença na intensidade dos spots nas diferentes condições. Os spots circulados em vermelho são os controles positivos de cada spot. Abreviações: MNC: meio não condicionado; MC: meio condicionado.

Das 23 citocinas possíveis de serem detectadas pelo arranjo de anticorpos, 4 foram significativamente aumentadas em MCs com valor de $p \leq 0,05$. As quatro citocinas identificadas foram: regulador do crescimento de oncogene (GRO), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e proteína 1 quimioatrativas de monócitos (MCP-1) (figura 23 A e C). Dos 41 fatores de crescimento possíveis de serem detectados nas membranas de arranjos, 6 estavam significativamente aumentados com valores de $p \leq 0,01$. Os seis fatores encontrados foram: fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento de ligação na proteína 1 tipo a insulina (IGFBP-1), -2 (IGFBP-2) e fator de crescimento tumoral β (TGF- β) (Figura 23 B e D).

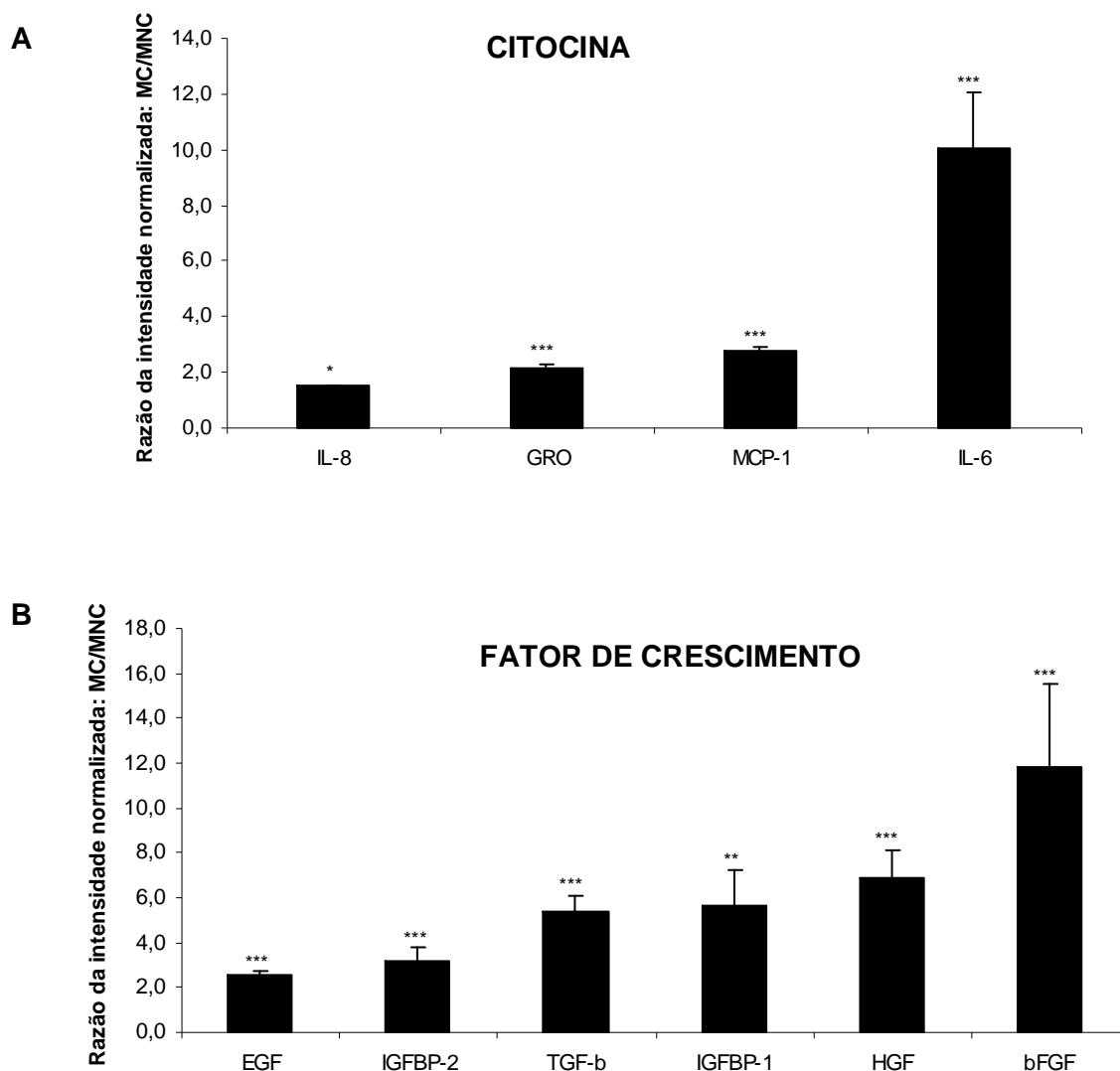


FIGURA 23 – CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO SIGNIFICATIVOS PRESENTES NOS MCS.

FONTE: A autora (2009)

NOTA: Eixo Y representa a razão das intensidades dos spots normalizadas. *-p<0,05; **-p<0,01; ***-p<0,001. As barras de erro representam o desvio padrão das quatro replicatas biológicas.

4.2 Avaliação do efeito dos MCs nas CTMs

4.2.1 Efeito sobre o número de células

Com o intuito de avaliar o potencial cardiomiogênico do MC, as CTMs foram cultivadas por 21 dias e analisadas após 6 e 21 dias. Durante os 6 dias de cultivo é possível observar que uma sub-população das CTMs adquire um aspecto mais

alongado que as demais células (Figura 24 E e F) as quais conservam o aspecto morfológico semelhante aos fibroblastos (Figura 24 A e B). Após a terceira semana de cultivo percebe-se que um número muito maior de células apresenta esse aspecto alongado (Figura 24 G e H), mas as culturas altamente confluentes dificultam essa observação.

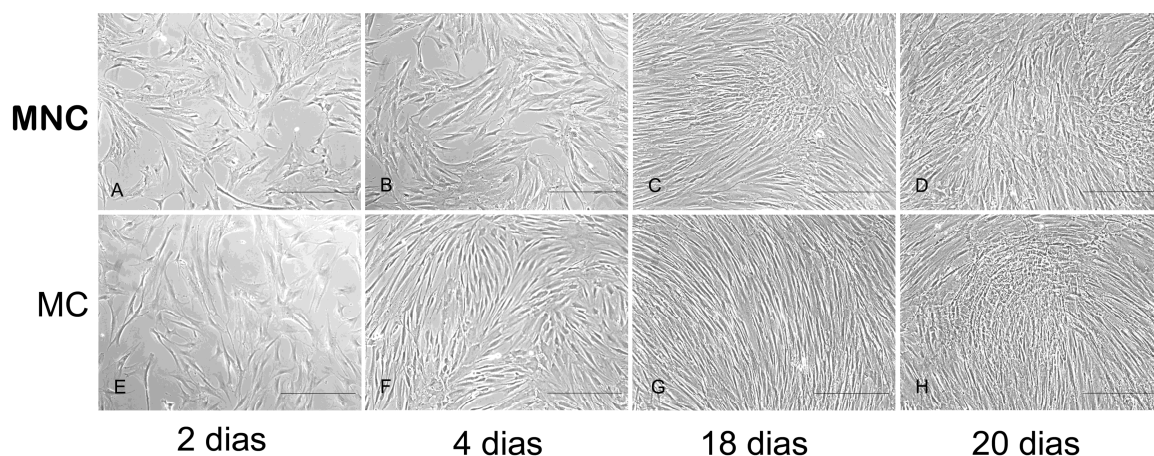


FIGURA 24 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DAS CÉLULAS TRATADA E NÃO TRATADAS.

FONTE: A autora (2008)

NOTA: As diferenças entre as condições são visualizadas através da obtenção de imagens. Na primeira semana de tratamento, onde as células que foram tratadas com MC (E-H) se observa que há uma quantidade maior de células quando comparadas com as condições em que as CTMs foram tratadas com MNC (A-D). Abreviações: MNC: meio não condicionado; MC: meio condicionado. A barra representa 30 μ m. As fotos das demais réplicas biológicas encontra-se nos anexos (Anexo V).

Através da contagem do número de células foi possível comprovar que há uma quantidade maior de células nas amostras que foram tratadas com MC e que essa diferença é evidente já no 6º dia de cultivo. O gráfico representa a razão das médias dos valores totais de CTMs do MC sobre o CT e mostra um aumento do número de células de aproximadamente 2 vezes acima do valor de razão 1 durante o cultivo de seis dias e de 21 dias. A aparente diminuição ocorrida na quantidade de células no cultivo de 21 dias comparado com o de 6 dias é devido à confluência celular atingida pelas células, mas mesmo assim o número de células é aumentado em relação ao nível basal de 1 (Figura 25).

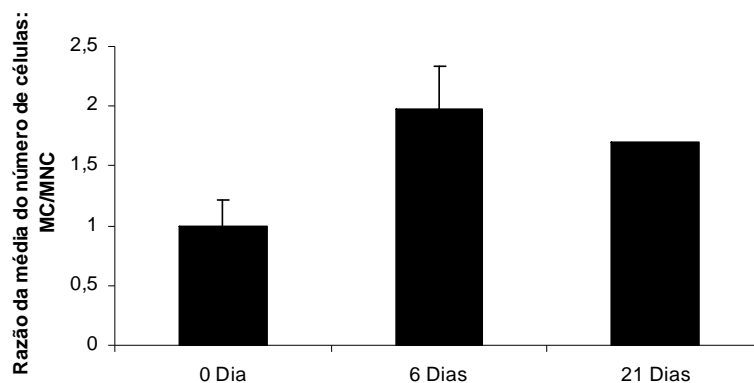


FIGURA 25 – GRÁFICO DA RAZÃO DAS MÉDIAS DO NÚMERO DE CÉLULAS

FONTE: A autora (2008)

NOTA: O eixo Y representa a razão da média do número total das células tratadas com MC e MNC.

4.2.2 Efeito sobre a expressão de marcadores cardíacos em nível de mRNA

O possível efeito cardiomiogênico dos MCs sobre as CTMs foi avaliado molecularmente através dos níveis de mRNA de genes cardíacos específicos como: troponina I, troponina T, conexina-43 e NKx 2,5 e gene específico do endotélio VEGF. Os níveis de mRNA foram estabelecidos semi-quantitativamente por RT-PCR para os genes: troponina I, troponina T, conexina-43, NKx 2,5 e VEGF e por PCR quantitativo para conexina-43 e VEGF.

Para avaliar se as condições das reações, como por exemplo temperatura de anelamento e concentração de primers estavam corretas, bem como avaliar a funcionalidade dos primers, foi utilizado como controle positivo RNA total extraídos de células de cultura primária que migram dos explantes cardíacos.

Através da RT-PCR, já é possível observar que ocorre a expressão de alguns genes cardíacos como conexina 43, troponina T, troponina I e do endotelial VEGF, logo após a primeira semana de cultivo. No entanto, os níveis de mRNA aumentam e se tornam mais evidentes na terceira semana para as três replicatas biológicas analisadas. O mRNA do gene Nkx 2,5 é evidente apenas na terceira semana de cultivo (Figura 26) e mais claramente para 2 das 3 amostras analisadas.

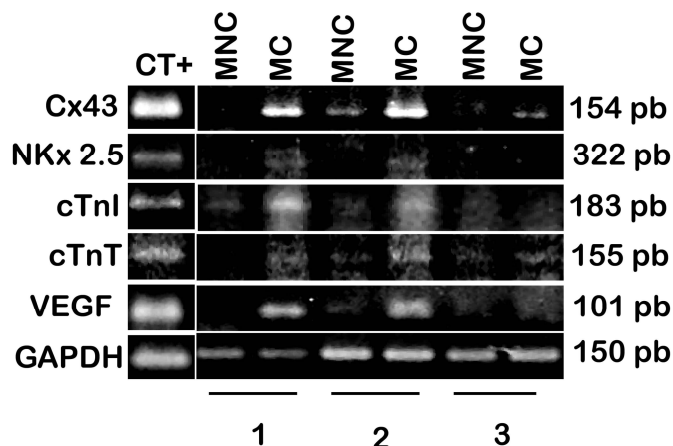


FIGURA 26 – PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES CARDÍACOS E ENDOTELIAIS DAS AMOSTRAS TRATADAS E NÃO TRATADAS NO CULTIVO DE 21 DIAS.

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Abreviações: Cx43: conexina 43; cTnI: troponina I; cTnT: troponina T; Nkx2.5: fator transcricional relacionado ao locus 5; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; MNC: meio não condicionado; MC: meio condicionado. O painel completo com a expressão dos genes durante os 6 dias e 21 dias de cultivo encontra-se nos anexos (Anexo VI).

Todos os marcadores cardíacos e o endotelial apresentaram elevados níveis de expressão de mRNA nas amostras que foram tratadas com MC quando comparadas com as amostras controle. Entretanto algumas CTMs do controle também apresentaram um baixo nível de expressão desses genes. Foram analisadas as expressões dos genes conexina 43 e VEGF por PCR quantitativo em tempo real e os valores adquiridos foram normalizados com os dados referentes ao GAPDH. Ambos os genes apresentaram um pequeno aumento de expressão já na primeira semana em todas as amostras, sendo que na terceira semana essa expressão foi aumentada de 2-4 vezes em duas amostras e se apresentou abaixo do valor de razão 1 em uma amostra (Figura 28).

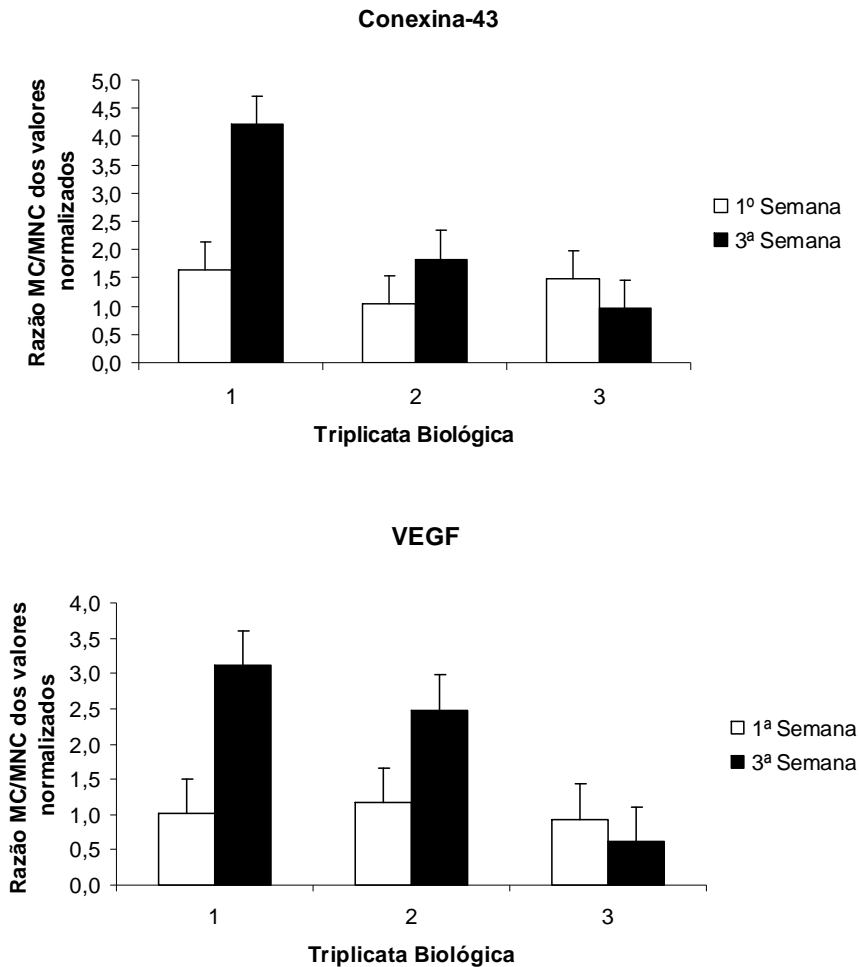


FIGURA 27 – PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES CARDÍACOS E ENDOTELIAIS

FONTE: A autora (2009)

NOTA: O eixo Y representa a razão dos valores normalizados de células tratadas com MC e MNC.

4.2.3 Imunolocalização das proteínas cardíacas nas CTMs tratadas com MC

Para avaliar o efeito do MC sobre as CTMs em nível de proteína, foram realizados estudos de imunolocalização de proteínas envolvidas com a contração muscular como troponina I, troponina T e α -actinina, bem como proteínas que possam auxiliar na transmissão de sinais intracelulares através da formação de junções gap como as conexinas 43.

Claramente foram observadas diferenças entre as amostras tratadas com MC e controle. Após uma semana de cultivo já é possível detectar que uma subpopulação apresenta marcação positiva para troponina I, troponina T e α -actinina (Figura 28 E, G e H) nas amostras tratadas com MC em comparação com as células

do controle (Figura 28 A, C e D), onde não eram evidentes células marcadas. Para todas as amostras, a grande maioria das células positivas para as troponinas eram aquelas que também apresentavam morfologia alongada e o núcleo destas células também se mostrou alongado, conforme evidenciado pelo DAPI (Figura 28 E-H).

Na terceira semana de cultivo a quantidade de células alongadas positivas para esses marcadores é mais evidente tanto quando se refere ao número absoluto de células quanto à intensidade maior de fluorescência (Figura 28 M, O e P). Também é notável que as células com morfologia e núcleo alongados, mostram o núcleo com uma marcação de DAPI mais forte quando comparadas com células que apresentam o núcleo circular (Figura 28 M, O e P).

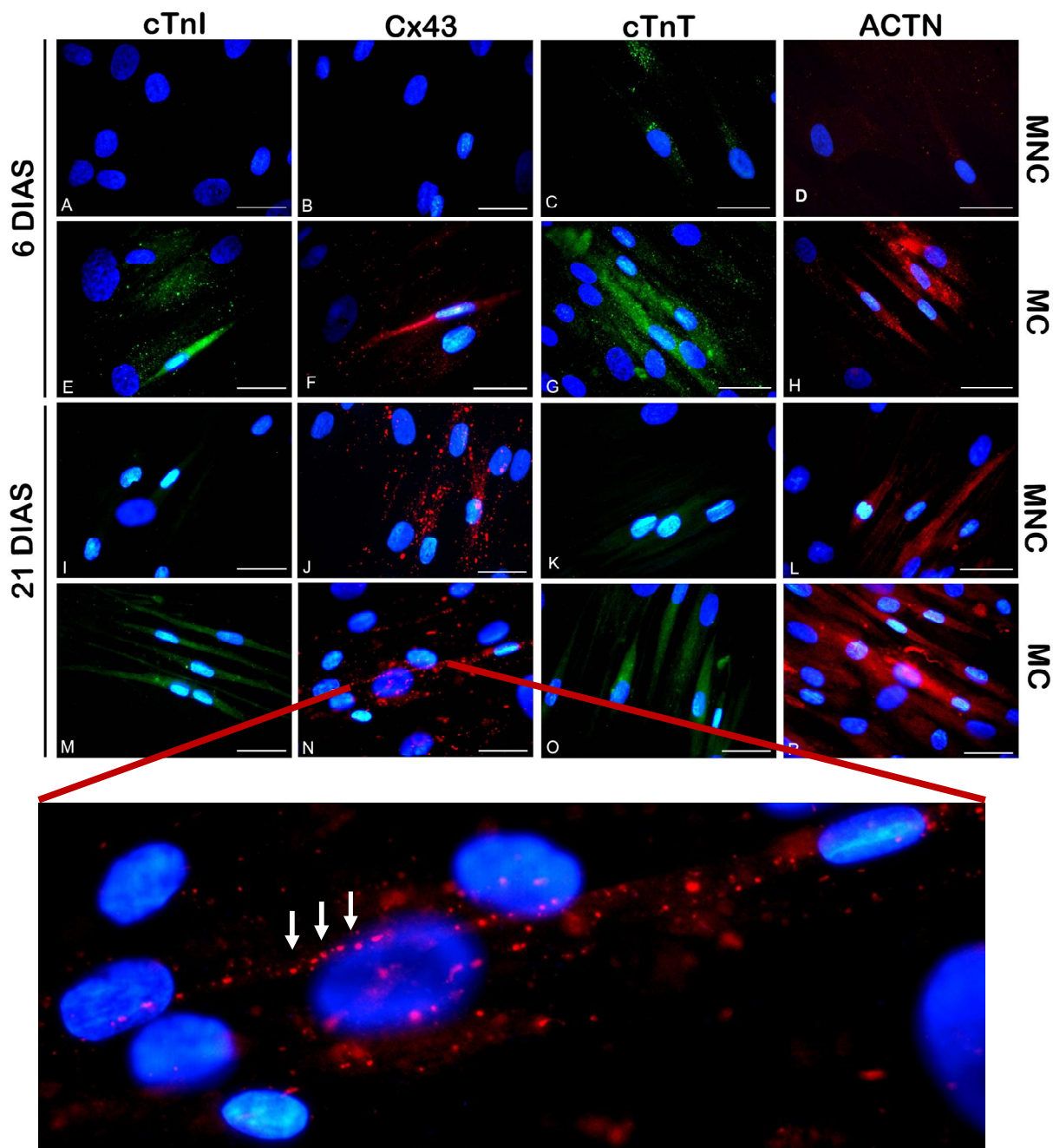


FIGURA 28 – PAINEL DOS ESTUDOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

FONTE: A autora (2009)

NOTA: A figura representa apenas uma réplica biológica. As fotos de IFI das demais réplicas estão no anexo VII. Os marcadores utilizados para as análises de imunofluorescência estão indicados em cima da figura. Os dias de tratamento são mostrados no lado esquerdo e o tipo de meio utilizado nos cultivos das CTMs no lado direito (MC ou MNC). Os núcleos estão marcados com DAPI. Os resultados representam três experimentos independentes. As flechas mostram as marcações de troponina nas bordas de células adjacentes. Abreviações: Cx43, Conexina-43; cTnI, troponina cardíaca I; cTnT, troponina cardíaca T; ACTN, α -actinina. Barra da escala= 30 μ m.

Embora algumas CTMs não tratadas com MC tenham sido positivas para troponina I e troponina T, sua quantidade é muito menor quando comparadas com aquelas tratadas com MC. Uma análise semi-quantitativa para troponina I e troponina T revelou que CTMs tratadas com MC, que tem a morfologia e o núcleo alongados, apresentam uma quantidade maior de células positivas para esses marcadores quatro vezes mais que as CTMs do controle. A porcentagem de células positivas para troponina I e troponina T foi analisada pela contagem de células totais e marcadas, de 10 campos aleatórios, para cada amostra e cada marcador. Na primeira semana a porcentagem média de células positiva para troponina I e troponina T foi de 3,4 ($\pm 1,3$) e 3.9 (± 1.7) respectivamente e na terceira semana de tratamento com MC, as porcentagens médias dos mesmos marcadores foram de 4.7 (± 1.7) e 5.0 (± 2.2) respectivamente.

Quando foram calculadas as razões das porcentagens de células positivas para ambos os marcadores, o resultado foi em torno de 4 e nenhuma diferença significativa foi observada nem entre os marcadores nem entre as semanas de cultivo (figura 30).

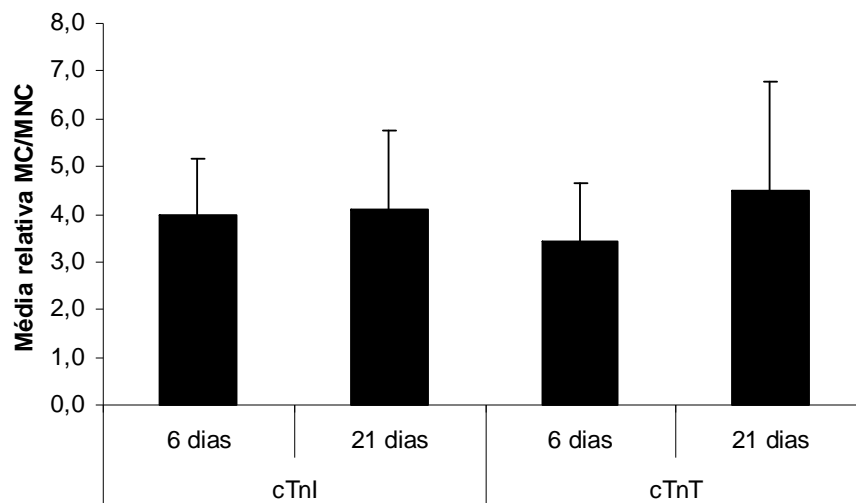


FIGURA 29 – QUANTIDADE DE CTMs POSITIVAS PARA TROPONINA I E TROPONINA T

FONTE: A autora (2009)

NOTA: O eixo Y representa a razão das médias dos valores totais das CTMs positivas para os troponina I e troponina T do MC sobre o MNC

Apesar da técnica de RT-PCR ter mostrado que os níveis do transcrito de conexina-43 aumentam nas culturas tratadas com meio condicionado, nenhuma diferença grande foi observada nas análises de IFI entre as células controle e

tratadas com MC. No entanto, a marcação para a conexina-43 foi observada nas bordas de células adjacentes (“pontos” vermelhos alinhados, Figura 33) majoritariamente nas culturas tratadas com MC por três semanas.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho de dissertação mostrou que os explantes cardíacos humanos liberam macromoléculas como citocinas, fatores de crescimento e proteínas do miocárdio ou do metabolismo celular no meio condicionado. Assim, foi possível identificar no MC um total de 20 proteínas. Como mostrado por géis SDS-PAGE e 2-DE, essas proteínas são somente uma fração do número total de proteínas presentes no MC, pois para uma maior identificação dessas proteínas seria necessário um método mais acurado e abrangente. Também foi mostrado que o meio condicionado aumenta o número de células das CTMs *in vitro* quando tratadas com o meio. No entanto ainda será necessário comprovar se o aumento do número de células é devido à indução da mitose e/ou efeitos citoprotetores ou antiapoptóticos do MC. Também foi comprovado que as CTMs tratadas com MC *in vitro* se tornam mais alongadas e são induzidas a expressar marcadores específicos cardíacos, sugerindo que elas estejam diferenciando para células semelhantes a cardiomiócitos.

O coração é um órgão composto de muitos tecidos e tipos celulares diferentes. Todas essas células, por exemplo, células endoteliais e cardiomiócitos, são fontes potenciais de fatores parácrinos que podem auxiliar a reparar o tecido cardíaco logo após o infarto. Mais recentemente foram encontradas células-tronco adultas ou residentes no coração. As células-tronco residentes são células indiferenciadas, em número extremamente baixo, e que estão entre células diferenciadas de tecidos ou órgãos maduros (STASTNA *et al*, 2009). Além disso, tem sido mostrado que as células tronco residentes cardíacas são capazes de produzir e secretar uma grande variedade de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que estão envolvidos no reparo cardíaco (GNECCHI *et al*, 2008).

As células tronco residentes podem ser obtidas a partir de explantes cardíacos quem vêm sendo utilizados como fonte de células para cultivos primários. Barile e colaboradores (2007) descrevem que dos explantes orginários de espécimes de biópsias atriais e ventriculares ocorre uma migração de células que produzem uma monocamada de células heterogêneas na placa de cultivo.

Nesse contexto foi hipotetizado que os explantes cardíacos pudessem liberar um conjunto de fatores envolvidos com o reparo cardíaco (crescimento ou

diferenciação celular). Assim, nesse trabalho de dissertação os explantes foram utilizados como fonte de fatores parácrinos para gerar meios condicionados.

Os explantes foram cultivados por 6 dias em meio de cultivo IMDM para a obtenção dos MCs e, na maioria dos casos, esse tempo não é o suficiente para que as células migrem dos explantes para a placa de cultivo. De fato não foi observado migração de células a partir dos explantes.

Mesmo tendo lavado os explantes várias vezes antes do estabelecimento de cultivo, a presença de algumas proteínas estruturais (cMyBP-C e α -actin) e metabólicas (triosephosphate isomerase e malate dehydrogenase), identificadas por 2-DE/MALDI-TOF/TOF, é provavelmente devido a dissociação mecânica necessária para a obtenção dos explantes ou, talvez, devido aos processos necróticos/apoptóticos sofridos pelas células que ocorrem durante o tempo de cultura.

Muitos estudos têm identificado biomarcadores candidatos analisando as proteínas liberadas no sangue logo após o infarto do miocárdio. O biomarcador ideal para ser usado como um detector do infarto é aquele que possui especificidade cardíaca e é liberado rapidamente após o dano do miocárdio em altas concentrações e facilmente detectáveis (COLLINSON *et al.*, 2007; SADAYAPPAN *et al.*, 2006; YUAN *et al.*, 2006; JACQUET *et al.*, 2009).

Proteínas estruturais, tais como troponinas, têm sido detectadas na circulação e são atualmente utilizadas como marcadores do soro para necrose de células do miocárdio (BABUIN *et al.*, 2005; COLLINSON *et al.*, 2007; INBAR *et al.*, 2009). Foi demonstrado recentemente que MyBP-C é encontrada em coração de rato sujeito à reperfusão isquêmica (SADAYAPPAN *et al.*, 2006), em coração de cachorro sujeito a um baixo fluxo de isquemia (YUAN *et al.*, 2006) e no plasma de ratos com infarto agudo do miocárdio (JACQUET *et al.*, 2009). Jacquet (2009), através de experimentos de re-perfusão em que primeiro ele obstrui uma artéria de rato e depois deixa a corrente sanguínea fluir novamente, foi quem primeiro sugeriu que cMyBP-C talvez funcione como um excelente novo biomarcador de infarto devido aos altos níveis encontrados na circulação após a injúria e pela resposta rápida após o infarto.

Além de proteínas estruturais e metabólicas também foram identificadas proteínas antioxidantes como a peroxidoxina. O oxigênio e outros radicais livres são liberados durante o processo de isquemia devido ao estresse sofrido pelo tecido

com o dano do miocárdio e proteínas como a peroxidoxina estão envolvidas em neutralizar esses radicais livres (ZWEIER & TALUKDER, 2006), conferindo um efeito de citoproteção ao miocárdio danificado (SCHRODER *et al.*, 2008). Ratos que não apresentam a peroxidoxina mostram uma suscetibilidade à injúrias isquêmicas (MATSUSHIMA *et al.*, 2006) o que sugere que a peroxidoxina previne que outros infartos aconteçam (ARAKI *et al.*, 1999). Embora a peroxidoxina não tenha sido considerada significativa por causa do valor de $EV \geq 10^{-3}$ talvez ela tenha algum efeito citoprotetor nas CTMs impedindo a apoptose e aumentando assim o número de CTMs nas culturas tratadas com MC. Com técnicas mais efetivas, como por exemplo, um pré-fracionamento das proteínas do MC e com a utilização de espectrômetros mais sofisticados e acurados como o Orbitrap será possível determinar se de fato essa proteína é um componente dos MCs.

Juntamente com proteínas estruturais e metabólicas esperávamos identificar fatores de crescimento e citocinas, que também fossem liberadas pelas células dos explantes cardíacos ao meio condicionado. A maioria dos estudos de proteômica envolvendo células tronco tem contado com o auxílio do gel bidimensional (2-D), que separa proteínas de acordo com seu pI (carga) e massa (peso molecular); e com o auxílio da espectrometria de massas para a identificação de proteínas. No entanto o gel 2-D tem muitas limitações como, por exemplo: solubilização de proteínas hidrofóbicas de membranas e a identificação de proteínas de baixa abundância. Talvez pela baixa secreção dessas proteínas ao MC, ou por causa da perda de material pelas técnicas de precipitação e lavagem ou ainda pela pequena sensibilidade do MALDI-TOF/TOF em identificar fatores de baixa abundância, não foi possível o reconhecimento de citocinas e fatores de crescimento no MC por 2-DE/MALDI-TOF/TOF (MANN *et al.*, 2001).

Através da análise de arranjo de anticorpos foi demonstrado que os explantes cardíacos secretam citocinas como: GRO, IL-6, IL-8 e MCP-1 e fatores de crescimento como: bFGF, EGF, HGF, IGFBP-1, -2 e TGF- β ao MC. Por experimentos de re-perfusão cardíaca em ratos, Frangogianes (1998) mostrou que ocorre a ativação de citocinas das células de tecidos danificados pelo infarto, com a indução e liberação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 6 (IL-6). A IL-6 é mostrada como um fator liberado em resposta ao estresse causado pelos danos do miocárdio (MANN, 2003). Na fase aguda do infarto do miocárdio, a ativação inflamatória é aumentada com a predominante resposta pré-inflamatória e um

aumento no nível de IL-6 no soro (KARPIŃSKI *et al.*, 2009). A IL-6 é uma citocina pleiotrópica responsável por muitos processos diferentes incluindo: crescimento celular, apoptose, sobrevivência e diferenciação em vários tipos celulares e órgãos, inclusive o coração (BANERJEE *et al.*, 2009). A produção local ou sistêmica de mediadores inflamatórios talvez influencie não somente a migração das CTMs aos tecidos danificados (RIES *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008; GIRGENRATH *et al.*, 2006), mas também a proliferação, diferenciação (COYNE *et al.*, 2006) e a integração das CTMs exógenas aos tecidos danificados (NIAN *et al.*, 2004). Além disso, as citocinas como IL-6 podem induzir a secreção de fatores de quimiocinas importantes na regulação da angiogênese (FRANGOIANNIS, 2008).

A indução das quimiocinas ocorre como resposta inflamatória logo após o infarto do miocárdio (FRANGOIANNIS, 2007). Similarmente, neste trabalho foram identificadas quimiocinas como a IL-8, Gro- α e MCP-1. IL-8 e Gro- α trabalham conjuntamente na ativação de neutrófilos ao tecido danificado com infarto do miocárdio (MUKAIDA, 2000), além de participarem no processo de angiogênese (KOCH, *et al.*, 1992). Kocher e colaboradores (2006) descrevem que a produção de IL-8 e Gro- α por células endoteliais regulam a habilidade das quimiocinas induzirem a neovascularização, proteção contra a apoptose dos cardiomiócitos e recuperação da função cardíaca. MCP-1 tem importante efeito no recrutamento e ativação de macrófagos, síntese de citocinas e acúmulo de miofibroblastos durante o processo de cicatrização do coração causado pelo infarto. A ausência de MCP-1 resulta numa lentidão no processo de troca dos cardiomiócitos danificados pelo infarto (XIA & FRANGOIANNIS, 2007).

Como citado acima, muitas das citocinas estão envolvidas no processo de reparo do miocárdio infartado. A cicatrização do miocárdio infartado resulta de mudanças nas interações adesivas entre células endoteliais, na vasculatura pré-existente e na matriz extracelular que são reguladas por fatores localmente produzidos (citocinas e quimiocinas) e que levam a migração de células endoteliais, proliferação, reorganização e formação de pequenas veias (KOCHER *et al.*, 2006). Portanto, se fizermos um paralelo da cicatrização do miocárdio, que ocorre naturalmente, com meu modelo de estudo, é possível afirmar que as citocinas e quimiocinas presentes no MC talvez estejam agindo nas CTMs através do aumento da quantidade de células e/ou induzindo a diferenciação das células em cardiomiócitos, da mesma forma que ocorre *in vivo*.

Os fatores de crescimento como bFGF, EGF, HGF, IGFBP-1 e 2 e TGF- β também foram identificados no MC. Alguns desses fatores desenvolvem um papel no reparo tecidual e, como descrito na sessão de introdução, são também cruciais na especificação dos cardiomiócitos durante o desenvolvimento (PANDUR, 2005).

O fator de crescimento FGF juntamente com proteína morfogenética do osso (BMP) e com as proteínas Wnt são um dos fatores responsáveis pela indução da ativação de fatores transcricionais cardíacos durante a diferenciação cardíaca (WALTERS *et al.*, 2001). O maior receptor de FGF no coração é FGFR1 e experimentos com CTEs de camundongos diferenciadas em corpos embrióides confirmaram que quando esses corpos embrióides não possuíam o receptor de FGF as células não diferenciaram em cardiomiócitos, comprovando o papel de FGF na especificação dos cardiomiócitos durante o desenvolvimento cardíaco (RONCA *et al.*, 2009). Hahn (2008) por meio da indução da diferenciação de CTMs de camundongos com FGF e TGF- β comprovou que esses fatores de crescimento induziram o aumento da expressão de fatores transcricionais cardíacos como a Nkx 2.5, auxiliaram na diferenciação em células semelhantes à cardiomiócitos e exerceram efeitos citoprotetores nas CTMs.

TGF- β , um fator multipotente associado com a neoangiogênese, possui um papel na diminuição dos sinais inflamatórios e indução da diferenciação das CTMs (ABARBANELL *et al.*, 2008). Mais recentemente, Li *et al* (2008) descreveram que TGF- β induz a diferenciação de CTMs em cardiomiócitos imaturos e Chang (2008) através de estudo *in vitro* comprova que o cultivo prolongado de CTMs com TGF- β induz as CTMs a expressarem marcadores de superfície cardíacos. Entretanto Hermona e colaboradores (2007) afirmaram que os efeitos prolongados de TGF- β *in vivo* necessitam de mais estudos já que TGF- β pode causar hipertrofia nos cardiomiócitos.

Estudos *in vitro* também comprovam que o cultivo prolongado de CTMs ao HGF induz as CTMs a expressarem marcadores de superfície cardíacos, além de estar envolvido na migração, proliferação e diferenciação das CTMs (FORTE *et al.*, 2006).

Recentemente Zhuo (2008) e colegas mostraram que IGFBP-4 pode induzir a diferenciação de células carcinoma embrionárias a cardiomiócitos por agir independente do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e por antagonizar a via Wnt/ β -catenina através de interações direta com os receptores Frizzled e

LDLR-relacionado as proteínas 5/6 (LRP5/6). Análises de imunoprecipitação e western blot demonstram que IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4 e IGFBP-6, mas não IGFBP-3 ou IGFBP-5 interagem com LRP6 ou Frz8CRD. Além disso, estudos com ratos “knock out”, testando cada um dos IGFBPs separadamente e combinados, mostrou que IGFBP-1 e -2 são geneticamente semelhantes com IGFBP-4.

Os receptores de Wnt existentes em CTEs talvez existam em CTMs e da mesma maneira que IGFBP-4 tem funcionalidade nas CTEs para a diferenciação é possível que IGFBP-1 e -2 encontrados em nossas condições experimentais tenham funcionalidade apenas em CTMs. Ainda, IGFBP-1 e -2 talvez induzam as CTMs a diferenciar em células semelhantes a cardiomiócitos, possivelmente por antagonizar a sinalização Wnt. É possível que os demais fatores de crescimento e citocinas, bem como outros fatores que não foram identificados, estejam agindo em conjunto na indução das CTMs à células semelhantes a cardiomiócitos promovendo a expressão de marcadores cardíacos nas CTMs, como indicado por RT-PCR e imunofluorescência.

A eficácia dos transplantes de CTMs seria melhorada se houvesse uma pré-diferenciação destas células em cardiomiócitos *in vitro* antes dos transplantes *in vivo* evitando a diferenciação das CTMs à tipo celular não desejado (RANGAPPA *et al.*, 2003). Alguns trabalhos propõem que o tratamento de CTMs com fatores de crescimento como FGF (HAHN *et al.*, 2008) e com citocinas (ABARBANELL *et al.*, 2009) como IL-6, talvez facilitem a diferenciação das CTMs em cardiomiócitos. Sabendo que em nosso MC poderiam ser encontrados, e de fato foram encontrados, fatores de crescimento e citocinas, as CTMs foram cultivadas com MC de explantes cardíacos. Interessantemente elas expressaram marcadores cardíacos em nível de mRNA e proteína.

É interessante ressaltar que as CTMs tratadas com meio IMDM suplementado com 5% de soro fetal bovino também expressaram alguns dos genes cardíacos e células imunopositivas para troponinas. A expressão espontânea de marcadores musculares por CTMs tem sido descrito em outros artigos (SESHI *et al.*, 2003; ANTONITSIS *et al.*, 2007; GONZALEZ *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2009) e conforme descrito pelo grupo de Verfaillie, as CTMs são células “pluridiferenciadas” (JIANG *et al.*, 2002). Além disso, já foi descrito que a diferenciação *in vitro* de CTEs à células endócrinas pode ser induzida com níveis baixos de soro, em torno de 1% (VICENT & ODORICO, 2009). Recentemente Yang e colaboradores (2009) ao tratar células de

carcionomas embrionárias com 5-azactidina e baixa concentração de soro mostrou um aumento significativo na percentagem de células diferenciadas em relação ao controle. Assim, em nosso modelo a utilização de somente 5% de soro nos cultivos tratados com meio não condicionado pode ter induzido um pequeno grupo de células a expressarem marcadores cardíacos. De qualquer forma, as culturas tratadas com meio condicionado que também possuíam 5% de soro mostraram uma população muito maior de células que expressam marcadores cardíacos. A quantificação das CTMs tratadas e não tratadas com MC por IFI mostrou que 4,7-5 % das células possivelmente diferenciaram em células semelhantes a cardiomiocitos. Esta percentagem é muito maior que o que foi mostrado em outros trabalhos em que foram quantificadas as percentagens de células humanas diferenciadas *in vitro*; por exemplo, no modelo proposto por Rangappa e colaboradores (2003) utilizando 5-azcitidina apenas 0,05% das CTMs tratadas diferenciaram a cardiomiocitos.

O presente estudo demonstrou que os explantes cardíacos humanos liberam citocinas e fatores de crescimento no meio que são importantes para a indução das CTMs humanas a diferenciarem em células semelhantes a cardiomiócitos. Entretanto muitos estudos precisam ainda ser realizados como, por exemplo, identificar o perfil proteômico com técnicas mais sensíveis, descobrir se os fatores identificados são os responsáveis pela expressão dos marcadores cardíacos observados, como esses fatores estão agindo e por quais vias, se os efeitos dos fatores são citoprotetores ou indutores de diferenciação, entre outras tantas possibilidades.

Além disso, o modelo *in vitro* proposto nesse trabalho pode ajudar a entender os mecanismos de ação de fatores solúveis envolvidos com o reparo cardíaco. Descobrir qual é o efeito desses fatores nas células é possível pensar futuramente no estabelecimento de uma nova terapia baseada em proteínas.

6. CONCLUSÕES

- ❖ Foram identificadas em torno de 20 proteínas: estruturais, metabólicas, citocinas e fatores de crescimento;
- ❖ O meio condicionado promove o aumento do número de células por um efeito proliferativo e/ou citoprotetor (necrose/apoptose);
- ❖ Os MCs de explantes induzem as CTMs a expressarem marcadores específicos cardíacos comprovados pela porcentagem significativa de células marcadas.

7. PERSPECTIVAS

- ❖ Identificar por um método mais sensível e acurado como o Orbitrap o proteoma dos meios condicionados dos explantes cardíacos humanos;
- ❖ Avaliar os efeitos citoprotetores dos fatores solúveis nas células tronco mesenquimais *in vitro* através de ensaios com anexina V e iodeto de propídeo;
- ❖ Definir qual a função de IGFBP-1 e -2 durante a proliferação e diferenciação das CTMs a cardiomiócitos através do cultivo das CTMs com essas proteínas recombinantes;
- ❖ Identificar a possível via de sinalização de IGFBP-1 e -2 nas células tronco mesenquimais por meio de ensaios de RNA de interferência;
- ❖ Avaliar os efeitos fisiológicos dos fatores solúveis do meio condicionado através de ensaios pré-clínicos em corações de ratos infartados.

8. REFERÊNCIAS

- ABARBANELL, A. M.; COFFEY, A. C.; FEHRENBACHER, J. W.; BECKMAN, D. J.; HERRMANN, J. L. **Proinflammatory cytokine effects on mesenchymal stem cell therapy for the ischemic heart.** Ann Thorac Surg, 88(3):1036-43. 2009.
- AHMED, N.; DREIER, R.; GOPFERICH, A.; GRIFKA, J.; GRASSEL, S. **Soluble factors derived differentiated cartilage tissue affect chondrogenic differentiation of rat adult marrow stromal cells.** Cell physiol biochem: 20, 665-678. 2007.
- AMIT, M.; CARPENTER, M. K.; INOKUMA, M. S.; CHIU, C. P.; HARRIS, C. P.; WAKNITZ, M. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; THOMSON, J. A. **Clonally derived human embryonic stem cells lines maintains pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture.** Dev. Biol, 227: 271-278. 2000.
- ANTONISTIS, P.; PAPAGIANNAKI, E. I.; KAIDOGLOU, A.; PAPAKONSTANTINO, C. **In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacitidine.** Interact Cardio Vasc Thorac Surg, 6: 593-597. 2007.
- ARAKI, M.; NANRI, H.; EJIMA, K.; MURASATO, Y.; FUJIWARA, T.; NAKASHIMA, Y.; IKEDA, M. **Antioxidant function of the mitochondrial protein SP-22 in the cardiovascular system.** J Biol Chem, 274: 2271-2278. 1999
- BABUIN, L.; JAFFE, A. S. **Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury.** CMAJ, 173(10):1191-202. 2005.
- BALLARD, V. L.; EDELBERG, J. M. **Stem cells for cardiovascular repair – The challenges of the aging heart.** J Mol Cell Cardiol, 45(4): 582-92. 2008.
- BANERJEE, I.; FUSELER, J. W.; INTWALA, A. R.; BAUDINO, T. A. **IL-6 loss causes ventricular dysfunction, fibrosis, reduced capillary density, and dramatically alters the cell populations of the developing and adult heart.** Am J Physiol Heart Circ Physiol, 296(5): 1694-1704. 2009.
- BARILE, L.; MESSINA, E.; GIACOMELLO, A.; MARBÁN, E. **Endogenous cardiac stem cells.** Progress in cardiovascular diseases, 50: 31-48. 2007.
- BAUDINO, T. A.; CARVER, W.; GILES, W.; BORG, T. K. **Cardiac fibroblasts: friend or foe?** Am J Physiol Heart Circ Physiol, 291: 1015-1026. 2006.

BELTRAMI, A. P.; BARLUCCHI, L.; TORELLA, D.; BAKER, M.; LIMANA, F.; CHIMENTI, S.; KASAHARA, K.; ROTA, M.; MUSSO, E.; URBANEK, K.; LERI, A.; KAJSTURA, J.; GINARDI, B. N.; ANVERSA, P. **Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration.** Cell, 114: 763-776. 2003.

BELTRAMI, A. P.; URBANEK, K.; KAJSTURA, J.; YAN, S. M.; FINATO, N.; BUSSANI, R.; NADAL-GINARD, B.; SILVESTRI, F.; LERI, A.; BELTRAMI, C. A.; ANVERSA, P. **Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction.** New England Journal of Medicine, 344(23): 1750-1757. 2001.

BENGEL, F. M.; SCHACHINGER, V.; DIMMELER, S. **Cell-based therapies and imaging in cardiology.** Eur J Nucl Med Mol Imaging, 32: 404-416. 2005.

BLUM, B.; BENVENISTY, N. **The tumorigenicity fo human embryonic stem cells.** Advances in cancer research, 100: 133-158. 2008.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. **Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.** Electrophoresis 8(2): 93-99. 1987

BROFMAN, P. R.; CARVALHO, K. A.; GUARITA-SOUZA, L. C.; REBELATTO, C.; HANSEN, P.; SENEGAGLIA, A. C.; MYAGUE, N.; FURUTA, M.; FRANCISCO, J. C.; OLANDOSKI, M. **Transplante celular: análise funcional, imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células.** Rev Bras Cardiovasc, 19: 261-266. 2004.

BURLACU, A.; ROSCA, A. M.; MANIU, H.; TITORENCU, I.; DRAGAN, E.; JINGA, V.; SIMIONESCU, M. **Promoting effect of 5-azacytidine on the myogenic differentiation of bone marrow stromal cells.** Eur J Cell Biol, 87: 173-184. 2008.

BURT, R. K.; LOH, Y.; PEARCE, W.; BEOHAR, N.; BARR, W. G.; CRAIG, R.; WEN, Y.; RAPP, J. A.; KESSLER, J. **Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases.** Jama, 299: 925-936. 2008.

CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. **Mesenchymal ste cells as trophic mediators.** J Cell Bioch, 98(5): 1076-84. 2006.

CHANG SA, LEE EJ, KANG HJ. **Impact of myocardial infarct proteins and oscillating pressure on the differentiation of mesenchymal stem cells: effect of acute myocardial infarction on stem cell differentiation.** Stem Cells, 26: 1901–12. 2008.

CHAPMAN, A. R. **The ethics of patenting human embryonic stem cells.** Kennedy Inst Ethics J, 19(3):261-88. 2009.

CHIN, A. C. P.; FONG, W. J.; GOH, L. T.; PHILP, R.; OH, S. K. W.; CHOO, A. B. H. **Identification of proteins from feeder conditioned medium that support human embryonic stem cells.** Journal of Biotechnology, 130: 320-328. 2007.

CHO, H. J.; LEE, N.; LEE, J. Y.; CHOI, Y. J.; LI, M.; WECKER, A.; JEONG, J. O.; CURRY, C.; QIN, G.; YOON, Y. S. **Role of host tissues for sustained humoral effects after endothelial progenitor cell transplantation into the ischemic heart.** J Exp Med, 204: 3257-3269. 2007.

CHRISTOFOROU, N.; GEARHART, J. D. **Stem cells and their potential in cell-based cardiac therapies.** Progress in cardiovascular diseases, 49: 396-413. 2007.

COHEN, E. D.; TIAN, Y.; MORRISEY, E. **Wnt signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal.** Development, 135: 789-798. 2008.

COLLINS, J. M.; RUSSELL, B. **Stem cell therapy for cardiac repair.** J Cardiovasc Nurs, 24(2):93-7. 2009

COLLINSON, P. O.; GAZE, D. C.; MORRIS, F.; MORRIS, B.; PRICE, A. **Comparison of biomarker strategies for rapid rule out of myocardial infarction in the emergency department using ACC/ESC diagnostic criteria.** Ann Clin Biochem, 44(1): 94-5. 2007.

COYNE, T. M.; MARCUS, A. J.; WOODBURY, D.; BLACK, I. B. **Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia.** Stem Cells, 24: 2483-2492. 2006.

CREMEERS, E. E. J. M.; CLEUTJENS, J. P. M.; SMITS, J. F. M.; DAEMEN, M. J. A. P. **Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure?** Circ Res, 89: 201-210. 2001.

DE UGARTE, D. A.; MORIZONO, K.; ELBARBARY, A.; ALFONSO, Z.; ZUK, P. A.; ZHU, M.; DRAGOO, J. L.; ASHIJAN, P.; THOMAS, B.; BENHAIM, P.; CHEN, I.; FRASER, J. **Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow.** Cells Tissues Organs, 174(3): 101-9. 2003.

DIWAN, A.; DORN, G. W. **Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets.** Physiology, 22: 56-64. 2007.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTEBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.** The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy, 8(4): 315-317. 2006.

ELGEMANN, M. G.; FRANZ, W. M. **Stem cell therapy after myocardial infarction: ready for clinical application?** Curr Opin Mol Ther, 8: 396-414. 2006.

FLAHERT, M. P.; DAWN, B. **Noncanonical Wnt11 signaling and cardiomyogenic differentiation.** Trends Cardiovasc Med, 18: 260-268. 2008.

FORTE, G.; MINIERI, M.; COSSA, P. **Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation.** Stem Cells, 24: 23-33. 2006.

FRANGOIANNIS, N. G. **Chemokines in ischemia and reperfusion.** Thromb Haemost, 97: 738-47. 2007.

FRANGOIANNIS, N. G. **The immune system and cardiac repair.** Pharmacol Res, 58(2): 88-111. 2008.

FRANGOIANNIS, N. G.; YOUKER, K. A.; ROSSEN, R. D.; GWECHENBERGER, M.; LINDSEY, M. H.; MENDOZA, L. H. **Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion.** J Mol Cell Cardiol, 30: 2567-76. 1998.

GAUSTAD, K. G.; BOQUEST, A. C.; ANDERSON, B. E.; GERDES, A. M.; COLLAS, P. **Differentiation of human adipose tissue stem cells using of rat cardiomyocytes.** Biochemical and Biophysical research communications, 314: 420-427. 2004.

GE, D.; LIU, X.; LI, L.; WU, J.; TU, Q.; SHI, Y.; CHEN, H. **Chemical and physical stimuli induce cardiomyocyte differentiation from stem cells.** Biochemical and biophysical research communications, 381: 317-321. 2009.

GERSH, B. J.; SIMARI, R. D.; BEHFAR, A.; TERZIC, C. M.; TERZIC, A. **Cardiac Cell Repair Therapy: A Clinical Perspective.** Mayo Clin Proc, 84(10):876-892. 2009.

GIRGENRATH, M.; WENG, S.; KOSTEK, C. A.; BROWNING, B.; WANG, M. **TWEAK, via its receptor Fn14, is a novel regulator of mesenchymal progenitor cells and skeletal muscle regeneration.** EMBO J, 25: 5826–5839. 2006.

GNECCHI, M.; HE, H.; LIANG, O. D.; MELO, L. G.; MORELLO, F.; MU, H.; NOISEUX, N.; ZHANG, L.; PRATT, R. E.; INGWALL, J. S.; DZAU, V. J. **Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells.** Nat Med, 11(4):367-8. 2005.

GNECCHI, M.; ZHANG, Z.; NI, A.; DZAU, V. J. **Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy.** Circ Res, 103(11):1204-19. 2008.

GONZALEZ, R.; MAKI, C. B.; PACCHIAROTTI, J.; CSONTOS, S.; PHAM, J. K. **Pluripotent marker expression and differentiation of human second trimester mesenchymal stem cells.** Biochem. Biophys. Res. Commun, 362: 491–497. 2007.

GRAUSS, R. W.; VAN TUYN, J.; STEENDIJK, P.; WINTER, E. M.; PIJNAPPELS, D. A.; HOGERS, B.; GITTENBERGER, D. E.; GROOT, A. C.; VANDERGEEST, R.; VANDERLAARSE, A.; DEVRIES, A. A.; SCHALIJ, M. J.; AT SMA, D. E. **Forced myocardin expression enhances the therapeutic effect of human mesenchymal stem cells after transplantation in ischemic mouse hearts.** Stem Cells, 26(4):1083-93. 2008

GRIVENNIKOV, I. A. **Embryonic stem cells and the problem of directed differentiation.** Biochemistry, 73: 1438-1452. 2008.

GUILLOT, P. V.; CUI, W.; FISK, N. M.; POLAK, D. J. **Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering.** Journal of cellular and molecular medicine, 11(5): 935-944. 2007.

GUO, X.; WANG, X. F. **Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways.** Cell Research, 19: 71-88. 2009.

HABIB, M.; CASPI, O.; GEPSTEIN, L. **Human embryonic stem cells for cardiomyogenesis.** J Mol Cell Cardiol, 45: 462-474. 2008.

HAHN, J. Y.; CHO, H. J.; KANG, H. J.; KIM, T. S.; KIM, M. H.; CHUNG, J. H.; BAE, J. W.; OH, B. H.; PARK, Y. B.; KIM, H. S. **Pre-treatment of mesenchymal stem cells with a combination of growth factors enhances gap junction formation, cytoprotective effect on cardiomyocytes, and therapeutic efficacy for myocardial infarction.** J Am Coll Cardiol, 51(9): 933-43. 2008.

HENG, B. C.; CAO, T.; HAIDER, H. K.; WANG, D. Z. M.; SIM, E. K. W.; NG, S. C. **An overview and synopsis of techniques for directing stem cell differentiation in vitro.** Cell tissue Res, 315: 291-303. 2004.

HERMONAT, P. L.; LI, D.; YANG, B.; MEHTA, J. L. **Mechanism of action and delivery possibilities for TGFbeta1 in the treatment of myocardial ischemia.** Cardiovasc Res, 74:235– 43. 2007.

INBAR, R.; SHOENFELD, Y. **Elevated cardiac troponins: the ultimate marker for myocardial necrosis, but not without a differential diagnosis.** Isr Med Assoc J, 11(1): 50-3. 2009.

IZADPANAH, R.; TRYGG, C.; PATEL, B.; KRIEDT, C.; DUFOUR, J.; GIMBLE, J. M.; BUNNELL, B. A. **Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue.** J Cell Biochem, 99(5):1285-97. 2006

JACQUET, S.; YIN, X.; SICARD, P.; CLARK, J.; SKANAGANAYAGAM, G. S. **Identification of cardiac myosin binding protein C as a candidate biomarker of myocardial infarction by proteomic analysis.** Mol Cell Proteomics. 2009

JIANG, Y.; VAESSEN, B.; LENVIK, T.; BLACKSTAD, M.; REYES, M. **Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain.** Exp. Hematol, 30: 896–904. 2002.

JOGGERST, S. J.; HATZOPOULOS, A. K. **Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers.** Expert Rev Mol Med, 11: 1-20. 2008.

KAMIHATA, H.; MATSUBARA, H.; NISHIUE, T.; FUJIYAMA, S.; TSUTSUMI, Y.; OZONO, R.; MASAKI, H.; MORI, Y.; IBA, O.; TATEISHI, E.; KOSAKI, A.; SHINTANI, S.; MUROHARA, T.; IMAIZUMI, T.; IWASAKA, T. **Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines.** Circulation, 104(9): 1046-52. 2001.

KARPIŃSKI, Ł.; PŁAKSEJ, R.; DERZHKO, R.; ORDA, A.; WITKOWSKA, M. **Serum levels of interleukin-6, interleukin-10 and C-reactive protein in patients with myocardial infarction treated with primary angioplasty during a 6-month follow-up.** Pol Arch Med Wewn, 119(3):115-21. 2009.

KEHAT, I.; KENYAGIN-KARSENTI, D.; SNIR, M. **Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes.** J Clin Invest, 108: 407-414. 2001.

KEHAT, I.; KHIMOVICH, L.; CASPI, O.; GEPSTEIN, A.; SHOFTI, R.; ARBEL, G.; HUBER, I.; SATIN, J.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; GEPSTEIN, L. **Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells.** Nat Biotechnol, 22(10): 1282-9. 2004.

KELLY, C. M.; PRECIOUS, S. V.; SCHERF, C.; PENKETH, R.; AMSO, N. N.; BATTERSBY, A.; ALLEN, N. D.; DUNNETT, S. B.; ROSSER, A. E. **Neonatal desensitization allows long-term survival of neural xenotransplants without immunosuppression.** Nat Methods, 6(4): 271-273. 2009.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLÜTER, H.; BIEBACK, K. **Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord, or adipose tissue.** Stem cells, 24: 1294-1301. 2006.

KESTENDJIEVA, S.; KYURCHIEV, D.; TSEVETKOVA, G.; MEHANDJIEV, T.; DIMITROV, A.; NIKOLOV, A.; KYURKCHIEV, S. **Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord.** Cell Biol Int, 32(7): 724-32. 2008.

KIM, S. C.; HAN, D. J.; LEE, J. Y. **Adipose tissue derived stem cells for regeneration and differentiation into insulin-producing cells.** Curr Stem cells Res Ther. 2009.

KIMARA, L.; TARGOFF, A. B.; THOMAS SCHELL, A.; DEBORAH YELON; KINNAIRD, T.; STABILE, E.; BURNETT, M. S.; SHOU, M.; LEE, C. W.; BARR, S.; FUCHS, S.; EPSTEIN, S. E. **Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms.** Circulation, 109(12):1543-9. 2004.

KOCH, A. E.; POLVERINI, P. J.; KUNKEL, S. L.; HARLOW, L. A.; DIPIETRO, L. A.; ELNER, V. M. **Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis.** Science, 258: 1798–801. 1992.

KOCHER, A. A.; SCHUSTER, M. D.; BONAROS, N.; LIETZ, K.; XIANG, G. **Myocardial homing and neovascularization by human bone marrow angioblasts is regulated by IL-8/Gro CXC chemokines.** J Mol Cell Cardiol, 40(4): 455-64. 2006.

KOMURO, I.; IZUMO, S. **Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart.** Proc Natl Acad Sci, 90: 8145-8149. 1993.

KONINCKX, R.; HENSEN, K.; DANIELS, A.; MOREELS, M.; LAMBRICHTS, I.; JONGEN, H.; CLIJSTERS, C.; MEES, U.; STEELS, P.; HENDRIKX, M.; RUMMENS J. L. **Human bone marrow stem cells co-cultured with neonatal rat cardiomyocytes display limited cardiomyogenic plasticity.** Cytotherapy, 11(6):778-92. 2009.

LAFLAME, M. A.; MURRY, C. E. **Regenerating the heart.** Nat. Biotechnol, 23: 845-856. 2005.

LEAVIS, P. C.; GERGELY, J. **Thin filament proteins and thin filament-linked regulation of vertebrate muscle contraction.** Crit Rev Biochem, 16: 235-305. 1984.

LEE, W. C.; SEPULVEDA, J. L.; RUBIN, J. P.; MARRA, K. G. **Cardiomyogenic differentiation potential of human adipose precursor cells.** Int. J. Cardiol, 133(3): 399-401. 2009.

LI, G.; ZHANG, X. A.; WANG, H.; WANG, X.; MENG, C. L.; CHAN, C. Y.; YEW, D. T.; TSANG, K. S.; LI, K.; TSAI, S. N.; NGAI, S. M.; HAN, Z. C.; LIN, M. C.; HE, M. L.; KUNG, H. F. **Comparative proteomic analysis of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord, and placenta: implication in the migration.** Proteomics, 9(1): 20-30. 2009.

LI, S. C.; WANG, L.; JIANG, H.; ACEVEDO, J.; CHANG, A. C.; LOUNDON, W. G. **Stem cell engineering for treatment of heart diseases: Potentials and challenges.** Cell Biol Int, 33(3): 255-67. 2009.

LI, T. S.; KOMOTA, T.; OHSHIMA, M.; QIN, S. L.; KUBO, M.; UEDA, K.; HAMANO, K. **TGF-beta induces the differentiation of bone marrow stem cells into immature cardiomyocytes.** Biochem Biophys Res Commun, 366(4):1074-80. 2008.

LI, T. S.; TAKAHASHI, M.; SUZUKI, R.; KOBAYASHI, T.; ITO, H.; MIKAMO, A.; HAMANO, K. **Pravastatin improves remodeling and cardiac function after myocardial infarction by an antiinflammatory mechanism rather than by the induction of angiogenesis.** Ann Thorac Surg, 81(6): 2217-25. 2006.

LI, X. H.; YU, X. Y.; LIN, Q. X.; DENG, C. Y.; SHAN, Z. H.; YANG, M.; LIN, S. **Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac**

phenotypes by cardiac microenvironment. Journal of molec ad cellu cardiol, 42: 295-303. 2007.

LI, X. H.; YU, X. Y.; LIN, Q. X.; SHAN, Z. X.; ZHANG, G. F.; ZHANG, X.; DENG, C. Y.; FU, Y. H.; KUANG, S. J.; HUANG, W.; YANG, M.; LIN, S. G. **Human bone marrow mesenchymal stem cells cocultured with semi-permeable membrane separated neonatal rat ventricular myocytes differentiated into cardiomyocyte phenotype.** Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 36(7): 651-4. 2009.

LINKE, A.; MÜLLER, P.; NURZYNSKA, D.; CASARSA, C.; TORELLA, D.; NASCIMBENE, A.; CASTALDO, C.; CASCAPERA, S.; BÖHM, M.; QUAINI, F.; URBANEK, K.; LERI, A.; HINTZE, T. H.; KAJSTURA, J.; ANVERSA, P. **Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function.** Proc Natl Acad Sci, 102(25): 8966-71. 2005.

LINTS, T. J.; PARSONS, L. M.; HARTLEY, L.; LYONS, I.; HARVEY, R. P. **Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants.** Development, 119: 419-431. 1993.

LIU, ZJ.; ZHUGE, Y.; VELAZQUEZ, O. C. **Trafficking and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells.** J. Cell. Biochem, 106: 984–991, 2009.

LOGAN, C. Y.; NUSSE, R. **The Wnt signaling pathway in development and disease.** Annu Rev Cell Dev Biol, 20: 781-810. 2004.

LYNGBAEK, S.; SCHNEIDER, M.; HANSEN, J. L.; SHEIKH, S. P. **Cardiac regeneratin by resident stem and progenitor cells in the adult heart.** Basic res cardiol, 102: 101-114. 2007.

MABLY ,J. D.; LIEW, C. C. **Factors Involved in Cardiogenesis and the Regulation of Cardiac-Specific Gene Expression.** *Circulation Research*, 79: 4-13. 1996.

MADONNA, R.; GENG, Y. G.; CATERINA, R. **Adipose tissue–derived stem cells characterization and potential for cardiovascular repair.** Arterioscler Thromb Vasc Biol, 29(11): 1723-9. 2009.

MALEKSHAH, A. K.; MOGHADDAM, A. E.; DARAKA, S. M. **Comparison of conditioned medium and direct co-culture of human granulosa cells on mouse embryo development.** Indian J Exp Biol, 44(3):189-92. 2006.

MANN, D. L. **Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation.** Annu Rev Physiol, 65:81-101. 2003.

MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. **Analysis of proteins and proteomics by mass spectrometry.** Annu Rev Biochem, 70: 437-73. 2001.

MANSBRIDGE, J. **Tissue-engineered skin substitutes in regenerative medicine.** Curr Opin Biotechnol. 2009.

MAREDDY, S.; BROADBENT, J.; CRAWFORD, R.; XIAO, Y. **Proteomic profiling of distinct clonal populations of bone marrow mesenchymal stem cells.** J Cell Biochem, 1;106(5): 776-86. 2009.

MARTIN-RENDON, E.; SWEENEY, D.; LU, F.; GIRDLESTONE, J.; NAVARRETE, C.; WATT, S. M. **5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies.** Vox Sang, 95(2): 137-48. 2008.

MATSUSHIMA, S.; IDE, T.; YAMATO, M.; MATSUSAKA, H.; HATTORI, F.; IKEUCHI, M.; KUBOTA, T.; SUNAGAWA, K.; HASEGAWA, Y.; KURIHARA, T.; OIKAWA, S.; KINUGAWA, S.; TSUTSUI, H. **Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice.** Circulation, 113: 1779-1786. 2006.

MERCADO-PIMENTEL, M. E.; RUNYAN, R. B. **Multiple transforming growth factor- β isoforms and receptors function during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart.** Cell tissue Organs, 185: 146-156. 2007.

MESSINA, E. D.; DE ANGELIS, L.; FRATI, G.; MORRONE, S.; CHIMENTI, S.; FIORDALISO, F.; SALIO, M.; BATTAGLIA, M.; LATRONICO, M. V.; COLETTA, M. **Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart.** Circ Res, 95: 911-921. 2004.

MIYAHARA, Y.; NAGAYA, N.; KATAOKA, M.; YANAGAWA, B.; TANAKA, K.; HAO, H.; ISHINO, K.; ISHIDA, H.; SHIMIZU, T.; KANGAWA, K.; SANO, S.; OKANO, T.; KITAMURA, S.; MORI, H. **Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction.** Nat Med, 12(4):459-65. 2006

MONTOYA, F. U.; VERFAILLIE, C. M.; HU, W. S. **Culture system for pluripotent stem cells.** Journal of bioscience and bioengineering, 1: 12-27. 2005.

MOORE, K. A.; LEMISCHKA, L. R. **Stem cells and their niches.** Sciences, 311: 1180-1885. 2006.

MUKAIDA, N. **Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation.** Int J Hematol, 72: 391–8. 2000.

MURRY, C. E.; KELLER, G. **Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development.** Cell, 132: 661-680. 2008.

MURRY, C. E.; SOONPAA, M. H.; REINECKE, H.; NAKAJIMA, H.; NAKAJIMA, H. O.; RUBART, M.; PASUMARTHI, K. B.; VIRAG, J. I.; BARTELMEZ, S. H.; POPPA, V.; BRADFORD, G.; DOWELL, J. D.; WILLIAMS, D. A.; FIELD, L. J. **Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts.** Nature, 428(6983): 664-8. 2004.

MUTSAERS, S. E. BISHOP, J. E.; MCGROUTHER, G.; LAURENT, G. J. **Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis.** International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 29: 5-17. 1997.

NAITO, A. T.; SHIOJIMA, I.; AKAZAWA, H.; HIDAKA, K.; MORISAKI, T.; KIKUCHI, A.; KOMURO, I. **Development stage-specific biphasic roles of Wnt/ β -catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoietics.** Proc Natl Acad, 103:19812-19817. 2006.

NAKANISHI, C.; YAMAGISHI, M.; YAMAHARA, K.; HAGINO, I.; MORI, H.; SAWA, Y.; YAGIHARA, T.; KITAMURA, S.; NAGAYA, N. **Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells.** Biochemical and biophysical research communications, 374: 11-16. 2008.

NESSELMANN, C.; MA, N.; BIEBACK, K.; WAGNER, W.; HO, A.; KONTTINEN, Y.T.; ZHANG, H.; HINESCU, M. E.; STEINHOFF, G. **Mesenchymal stem cells and cardiac repair.** J Cell Mol Med, 12(5B):1795-810. 2008.

NIH – <http://stemcells.nih.gov/info>

OHNISHI, S.; YASUDA, T.; KITAMURA, S.; NAGAYA, N. **Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells.** Stem Cells, 25(5):1166-77. 2007 .

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; LIMANA, F.; JAKONIUK, I.; QUAINI, F.; NADAL-GINARD, B.; BODINE, D. M.; LERI, A.; ANVERSA, P. **Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival.** Proc Natl Acad Sci, 98(18):10344-9. 2001.

PANDUR, P. **What does it take to make a heart?** Biol. Cell, 97: 192-210. 2005.

PARK, H. W.; SHIN, J. S.; KIM, C. W. **Proteome of mesenchymal stem cells.** Proteomics, 7: 2881-2894. 2007.

PARMACEK, M. S.; SOLARO, R. J. **Biology of the troponin complex in cardiac myocytes.** Progress in Cardiovascular Diseases, 47(3): 159-176. 2004.

PATEL, S. A; SHERMAN, L.; MUNOZ, J.; RAMESHWAR. **Immunological and properties of mesenchymal stem cells and clinical implications.** Arch. Immunol. Ther. Exp, 56: 1-8. 2008.

PEKOVIC, V.; HUTCHISON, C. J. **Adult stem cell maintenance and tissue regeneration in the ageing context: the role for A-type lamins as intrinsic modulators of ageing in adult stem cells and their niches.** J Anat, 213: 5-25. 2008.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** Science, 284(5411):143-7. 1999.

PLOTNIKOV, E. Y.; KRYAPENKOVA, T. G.; VASILEVA, A. K.; MAREY, M. V.; GALKINA, S. I.; ISAEV, N. K.; SHEVAL, E. V.; POLYAKOV, V. Y.; SUKHIKH, G. T.; ZOROV, D. B. **Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in coculture.** Journal of cellular and molecular medicine, 12: 1622-1631. 2007.

POUNTOS, I.; CORSCADDEN, D.; EMERY, P.; GIANNOUDIS, P. V. **Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application.** Injury, 4:S23-33. 2007

PROWSE, A. B. J.; MCQUADE, L. R.; BRYANT, K. J.; DYK, D. D. V.; TUCH, B. E.; GRAY, P. P. **A proteome analysis of conditioned media from human neonatal fibroblasts used in the maintenance of human embryonic stem cells.** Proteomics, 5: 1-12. 2005.

RANGAPPA, S.; ENTWISTLE, J. W.; WECHSLER, A. S.; KRESH, J. Y. **Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiomyogenic phenotype.** J Thorac Cardiovasc Surg, 126(1): 124-32. 2003.

RAPPSILBER, J.; ISHIHAMA, Y.; MANN, M. **Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics.** Anal Chem, 75(3): 663-670. 2003.

RATAKCZAK, M. Z.; ZUBA-SURMA, E. K.; WYSOCZYNSKI, M.; RATAJCZAK, J.; KUCIA, M. **Very small embryonic-like stem cells: characterization, developmental, origin and biological significance.** Exp Hematol, 36: 742-751. 2008.

REBELLATO, C. K.; AGUIAR, A. M.; MORETÃO, M. P., SENEGAGLIA, A. C.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; OLIVEIRA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.; MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V. F.; BROFMAN, P. S.; GOLDENBERG, S.; NAKAO, L. S.; CORREA, A. **Dissimilar differentiation potential of mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, umbilical cord blood and adipose tissue.** Experimental biology and medicine. 2008.

REINDERS, M. E.; FIBBE, W. E.; RABELINK, T. J. **Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation.** Nephrol Dial Transplant. 2009.

RICHARDS, M.; FONG, C. Y.; CHAN, W. K.; WONG, P. C.; BONGSO, A. **Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells.** Nat Biotechnol, 20: 933-936. 2002.

RIES, C.; EGEA, V.; KAROW, M.; KOLB, H.; JOCHUM, M. **MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines.** Blood, 109: 4055–4063. 2007.

ROCHE, S.; DELORME, B.; OOSTENDORP, R. A. J.; BARBET, R.; CATON, D.; NOEL, D.; BOUMEDIENE, K.; PAPADAKI, HA.; COUSIN, B.; CROZET, C.; MILHAVET, O.; CASTEILLA, L.; HATZFELD, J.; JORGENSEN, C.; CHARBORD, P.; LEHMANN, S. **Comparative proteomic analysis of human mesenchymal and embryonic stem cells: Towards the definition of a mesenchymal stem cell proteomic signature.** Proteomics, 9: 223-232. 2009.

RONCA, R.; GUALANDI, L.; CRESCINI, E.; CALZA, S.; PRESTA, M.; DELL'ERA, P. **Fibroblast growth factor receptor-1 phosphorylation requirement for**

cardiomyocyte differentiation in murine embryonic stem cells. J Cell Mol Med, 13(8A): 1489-98. 2009.

ROTA, M.; KAJSTURA, J.; HOSODA, T.; BEARZI, C.; VITALE, S.; ESPÓSITO, G.; IAFFALDANO, G.; PADIN-IRUEGAS, M. E.; GONZALEZ, A.; RIZZI, R.; SMALL, N.; MURASKI, J.; ALVAREZ, R.; CHEN, X.; URBANEK, K.; BOLLI, R.; HOUSER, S. R.; LERI, A.; SUSSMAN, M. A.; ANVERSA, P. **Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo.** Proc Natl Acad Sci, 104(45):17783-8. 2007.

SADAYAPPAN, S.; OSINSKA, H.; KLEVITSKY, R.; LORENZ, JN.; SARGENT, M. **Cardiac myosin binding protein C phosphorylation is cardioprotective.** Proc Natl Acad Sci, 103(45): 16918-23. 2006

SAMPATH, P.; MAZUMDER, B.; SESHADRI, V.; GERBER, C. A.; CHAVATTE, L. **Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene-specific silencing of translation.** Cell, 119: 195–208. 2004.

SCHINKÖTHE, T.; BLOCH, W.; SCHIMIDT, A. **In vitro secreting profile of human mesenchymal stem cells.** Stem cells dev, 17(1): 199-206. 2008.

SCHRODER, E., BRENNAN, J. P., AND EATON, P. **Cardiac peroxiredoxins undergo complex modifications during cardiac oxidant stress.** Am J Physiol Heart Circ Physiol, 295: 425-433. 2008.

SEGRS, V. F. M.; LEE, R. T. **Stem-cell therapy for cardiac disease.** Nature, 451: 937-942. 2008.

Sell, S. **Stem cells.** Stem Cell Handbook ed. by Sell, Pg. 1-18. 2004.

SESHI, B.; KUMAR, S.; KING, D. **Multilineage gene expression in human bone marrow stromal cells as evidenced by single-cell microarray analysis.** Blood Cells Mol. Dis, 31: 268–285. 2003.

SHI, Y.; MASSAGUÉ, J. **Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus.** Cell, 113: 685-700. 2003.

SHIOJIMA, I.; KOMURO, I.; MIZUNO, T.; AIKAWA, R.; AZAKAWA, H.; OKA, T.; YAMAZAKI, T.; YAZAKI, Y. **Molecular cloning and characterization of human homeobox genes CSX1.** Circ Res, 79: 920-929. 1996.

SILVERMAN, H. S.; PFEIFER, M. P. **Relation between use of anti-inflammatory agents and left ventricular free wall rupture during acute myocardial infarction.** American Journal of Cardiology, 59: 363-364. 1987.

STASTNA, M.; ABRAHAM, M. R.; VAN EYK, J. E. **Cardiac stem/progenitor cell, secreted proteins, and proteomics.** Febs, 583: 1800-1807. 2009.

STRAUER, B. E.; KORNOWSKI, R. **Stem cell therapy in perspective.** Circulation, 107(7): 929-34. 2003.

TARGOFF, K. L.; SCHELL, T.; YELON, D. **Nkx genes regulate heart tube extension and exert differential effects on ventricular and atrial cell number.** Dev Biol, 322(2):314-21. 2008.

THOMAS, P. S.; KASAHARA, H.; EDMONSON, A. M.; IZUMO, M. H.; YACOB, M. H.; BARTON, P. J.; GOURDIE, R. G. **Elevated expression of Nkx-2.5 in developing myocardial conduction cells.** Anat Rec, 263(3): 307-13. 2001.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S. **Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts.** Science, 282: 1145-1147. 1998.

TORELLA, D.; ELLISON, G. M.; KARAKIKES, I.; GINARD, B. N. **Resident cardiac stem cells.** Cell Mol Life Sci, 64: 661-673. 2007.

UENO, S.; WEIDINGER, G.; OSUGI, T.; KOHN, A. D.; GOLOB, J. L.; PABON, L.; REINECKE, H.; MOON, R. T.; MURRY, C. E. **Biphasic role for Wnt/ β -catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells.** Proc Natl Acad Sci, 104: 9685-9690. 2007.

URBICH, C.; AICHER, A.; HEESCHEN, C.; DERNBACH, E.; HOFMAN, W. K.; ZEIHNER, A. M.; DIMMELER, S. **Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitors cells.** J Mol Cell Cardiol, 39: 733-742. 2005.

VAN VLIET, P.; ROCCIO, M.; SMITS, A. M. S.; VAN OORSCHOT, A. A.; METZ, C. H.; VAN VEEN, T. A.; SLUIJTER, J. P.; DOEVENDANS, P. A.; GOUMANS, M. J. **Progenitors cells isolated from the human heart: a potential source for regenerative therapy.** Neth Heart J, 8: 211-218. 2008.

VEEMAN, M. T.; AXELROD, J. D.; MOON, R. T. **Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling.** Dev Cell, 5: 367-377. 2003.

VICENT, R. K.; ODORICO, J. S. **Reduced serum concentration is permissive for increased in vitro endocrine differentiation from murine embryonic stem cells.** Differentiation, 78(1): 24-34. 2009.

WALL, M. E.; BERNACKI, S. H.; LOBOA, E. G. **Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells.** Tissue Eng, 13(6): 1291-8. 2007.

WALTERS, M. J.; MAYAMAN, G. A.; CHIRSTIAN, J. L. **Bone morphogenetic protein function is required for terminal differentiation of the heart but not for early expression of cardiac marker genes.** Mech dev, 100: 263-273. 2001.

WANG, C. H.; CHERNG, W. J.; YANG, N. I.; KUO, L. T.; HSU, C. M. **Stanford, Late-outgrowth endothelial cells attenuate intimal hyperplasia contributed by mesenchymal stem cells after vascular injury.** Arterioscler.Thromb. Vasc. Biol, 28: 54-60. 2008.

WEIR, C.; MOREL-KOPP, MC.; GILL, A.; TINWORTH, K.; LADD, L.; HUNYOR, SN.; WARD, C. **Mesenchymal stem cells: isolation, characterization and *in vivo* fluorescent dye tracking.** Heart, Lung and Circulation, 1-9. 2008.

WIJK, B. V.; MOOORMAN, A. F. M.; VAN DEN HOFF, M. J. B. **Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation.** Cardiovascular research, 74: 244-255. 2007.

WU, M. Y.; HILL, C. S. **TGF- β superfamily signaling in embryonic development and homeostasis.** Develop Cell, 16: 329-343. 2009.

www.biocompare.com – acesso em: 22/11/09

www.policlin.com.br/drpoli/003/ - acesso em: 21/11/09

www.saude.gov.br – acesso em: 01/11/09

XIA, Y.; FRANGOIANNIS, N. G. **MCP-1/CCL2 as a therapeutic target in myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy.** In: *amm Allergy Drug Targets*, 6: 101–7. 2007.

YANG, J.; WEINBERG, R. A. **Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis.** *Dev Cell*, 14: 818-829. 2008.

YANG, L.; SOONPA, M. H.; ADLER, E. D.; ROEPKE, T. K.; KATTMAN, S. J.; KENNEDY, M.; HENCKAERTS, E.; BONHAM, K.; ABBOTT, G. W.; LINDEN, R. M.; FIELD, L. J.; KELLER, G. M. **Human cardiovascular progenitor cell develop from a KDR+ embryonic stem-cell-derived population.** *Nature*, 453: 524-528. 2008.

YANG, J.; KO, S. J.; KIM, H. S.; PARK, S.; HONG, D.; HONG, S. W.; CHOI, S. C.; HONG, S. J.; LIM, D. S. **Enhanced cardiomyogenic differentiation of p19 embryonal carcinoma stem cells.** *Korean Circ J*, 39(5): 198-204. 2009.

YUAN, C.; GUO, Y.; RAVI, R.; PRZYKLENK, K.; SHILKOFSKI, N. **Myosin binding protein C is differentially phosphorylated upon myocardial stunning in canine and rat hearts-- evidence for novel phosphorylation sites.** *Proteomics*, 6(14): 4176-86. 2006.

ZHANG, X.; WU, M.; ZHANG, W.; SHEN, J.; LIU, H. **Differentiation of human adipose-derived stem cells induced by recombinantly expressed fibroblast growth factor 10 in vitro and in vivo.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2009

ZHANG, Y.; CHU, Y.; SHEN, W.; DOU, Z. **First-trimester fetal mesenchymal stem cells towards cardiomyocyte-like cells. Effect of 5-azacytidine induction duration on differentiation of human.** *Interact CardioVasc Thorac Surg*, 9:943-946. 2009.

ZHUO, W.; SHIOJIMAYUZURU ITO, I.; LI, Z.; IKEDA, H.; YOSHIDA, M.; NAITO, A. T.; NISHI, J. I.; UENO, H.; UMEZAWA, A.; MINAMINO, T.; NAGAI, T.; KIKUCHI, A.; ASASHIMA, M.; KOMURO, I. **IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis.** *Nature*, 454: 345-349. 2008.

ZWEIER, J. L., AND TALUKDER, M. A. **The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury.** *Cardiovasc Res*, 70: 181-190. 2006.

ANEXOS

ANEXO I

O MALDI-TOF/TOF é uma técnica utilizada para a identificação de proteínas através de carga e massa molecular. Nessa técnica os peptídeos resultantes da digestão enzimática pelas tripsinas são irradiados por pulsos de laser para serem ionizados. Devido aos pulsos de laser, os íons adquirem energia cinética e são acelerados entrando no tubo de “vôo” do espectrômetro de massa. Os íons com menor m/z têm uma velocidade maior, atingindo o detector antes dos íons com maior m/z (Figura 1).

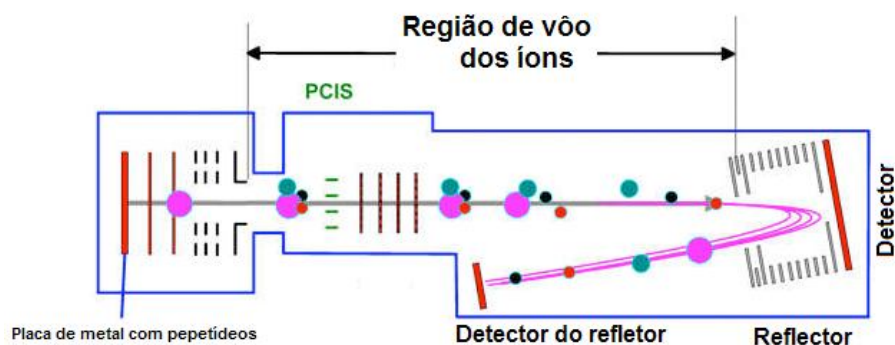


FIGURA 1 – MODELO DA PARTE INTERNA DO EQUIPAMENTO MALDI-TOF/TOF
FONTE: www.giga.ulg.ac.be (2009)

O software relaciona tempo de vôo com uma possível m/z gerando assim, o espectro de íons (Figura 2). Os números acima de cada barra são a massa molecular de cada íon e a altura da barra corresponde à abundância relativa (intensidade em %) desse íon na amostra (Figura 2).

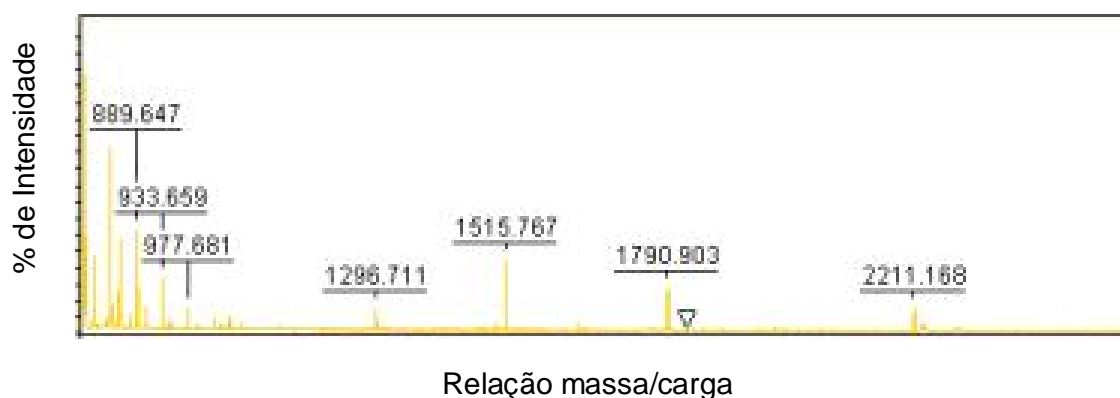


FIGURA 2 – GRÁFICO GERADO PELO SOFTWARE FLEXANALYSIS

FONTE: A autora (2009)

NOTA: Gráfico mostrando quais são os peptídeos mais presentes na amostra.

Esse conjunto de massas é então comparado com as massas moleculares de peptídeos que teoricamente seriam gerados por digestão trípica, da mesma maneira que a amostra em estudo, e que estão depositados em bancos de dados (databases) *on line*. A comparação resulta em uma lista de proteínas teóricas que podem corresponder à proteína analisada experimentalmente (Figura 3)

Quando a amostra tiver no mínimo 5 peptídeos que combinam com peptídeos teóricos dos databases ($p < 0,05$) ela pode ser considerada confiável para afirmar que de fato aquela amostra é a proteína apontada pelo programa de busca (MANN *et al*, 2001) pois o valor de $p < 0,05$ é a probabilidade de que essa combinação seja aleatória. Assim quanto maior a correspondência entre os peptídeos da amostra e os peptídeos teóricos menor é o valor esperado (EV) e mais confiável é a identificação experimental da proteína (Figura 3).

Concise Summary Report (Andressa_27) - Mozilla Firefox

Arquivo Editar Exibir Histórico Favoritos Ferramentas Ajuda

file:///I:\bmp_estserver/todosarquivos2/Andressa/mestrado/Resultados_proteômica/10Jun2009/Concise Summar

Mais visitados Guia rápido Últimas notícias

Concise Summary Report (A... Concise Summary Report (A... Concise Summary Report (A... Concise Summary Report (A... Concise Summary Repo...

Concise Protein Summary Report

Format As Concise Protein Summary Help

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits AUTO

Re-Search All Search Unmatched

- [gi|89574029](#) Mass: 48083 Score: 74 Expect: 0.0091 Queries matched: 9
mitochondrial ATP synthase, H+ transporting F1 complex beta subunit [Homo sapiens]

[gi|32189394](#) Mass: 56525 Score: 68 Expect: 0.031 Queries matched: 9
mitochondrial ATP synthase beta subunit precursor [Homo sapiens]

[gi|28931](#) Mass: 34026 Score: 44 Expect: 8.3 Queries matched: 6
beta-subunit (AA 1-312) [Homo sapiens]

[gi|119576273](#) Mass: 8994 Score: 35 Expect: 76 Queries matched: 4
hCG2036805 [Homo sapiens]
- [gi|28940](#) Mass: 57977 Score: 68 Expect: 0.035 Queries matched: 8
unnamed protein product [Homo sapiens]
- [gi|179279](#) Mass: 56861 Score: 44 Expect: 8.1 Queries matched: 7
ATP synthase beta subunit [Homo sapiens]

FIGURA 3 – RESULTADOS DA PESQUISA EM BANCO DE DADOS

FONTE: www.ncbi.nih.gov (2009)

NOTA: Circulado em vermelho está o EV que quanto menor, aumenta a probabilidade de identificação experimental da proteína.

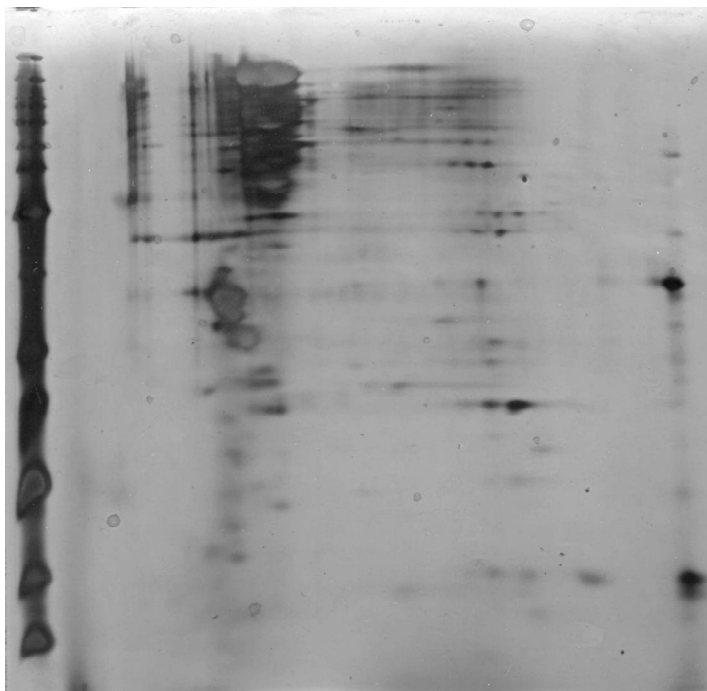
ANEXO II

Protocolos testados para preparação de proteínas para gel 2-DE que não foram eficientes para a precipitação e separação das proteínas.

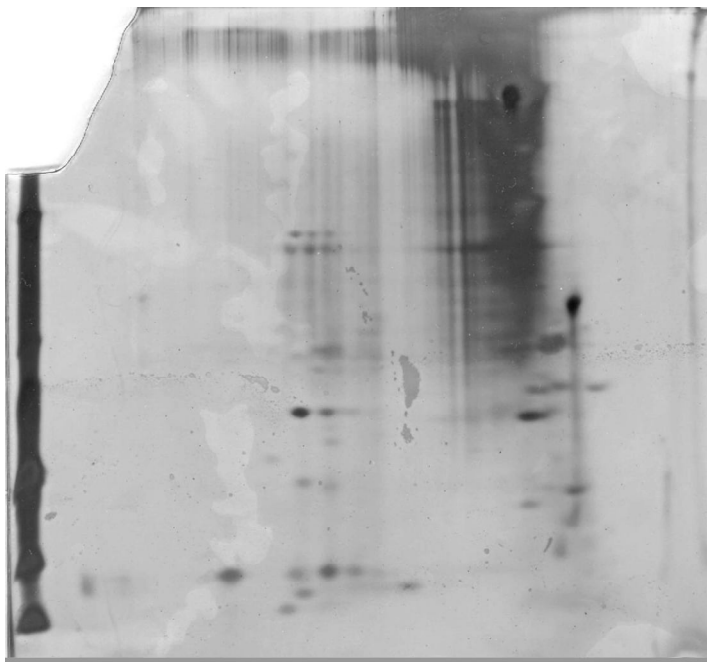
Protocolo 1: As proteínas do meio condicionado foram precipitadas por 1 h em gelo com 10% de ácido trifluoroacético (TCA) (MERCK) e centrifugados a 12000 x g por 15 min a 4°C, lavados duas vezes com 0,07% de β -mercaptoetanol diluído em acetona 100% (MERCK) e centrifugados a 12000 x g por 15 min a 4°C a cada lavagem. Ao final os meios foram lavados com acetona 80% e centrifugados a 12000 x g por 15 min a 4°C. O pellet foi ressuspensionado em uma solução de 7 M de uréia e 2 M de tioureia e reidratado em diferentes soluções:

	Solução 1	Solução 2	Solução 3	Solução 4	Solução 5
Uréia	8 M	9 M	8 M	9 M	5 M
Tioureia	x	x	x	x	2 M
Chaps	2 %	0,076 %	4 %	4 %	4 %
SDS	x	0,15 %	0,8 %	x	0,8 %
DTT	0,018 mM	10 mM	50 mM	25 mM	50 mM
Tris-HCl	40 mM	40 mM	30 mM	30 mM	30 mM
IPG-buffer	5 %	0,5%	1 %	1%	1 %
Triton	x	0,4 %	x	x	x

Gel 2-DE com proteínas re-hidratadas com solução 1



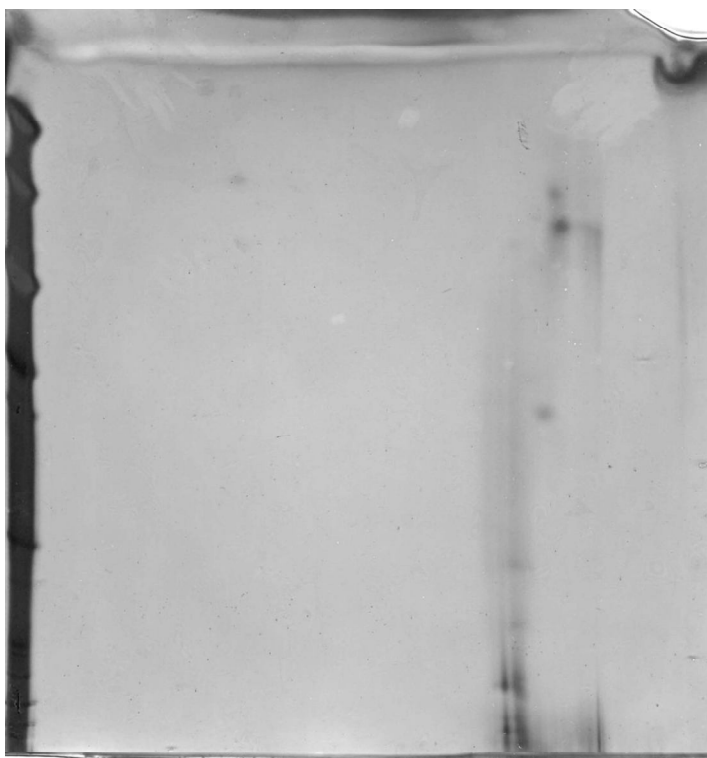
Gel 2-DE com proteínas re-hidratadas com solução 2



Gel 2-DE com proteínas re-hidratadas com solução 3



Gel 2-DE com proteínas re-hidratadas com solução 4



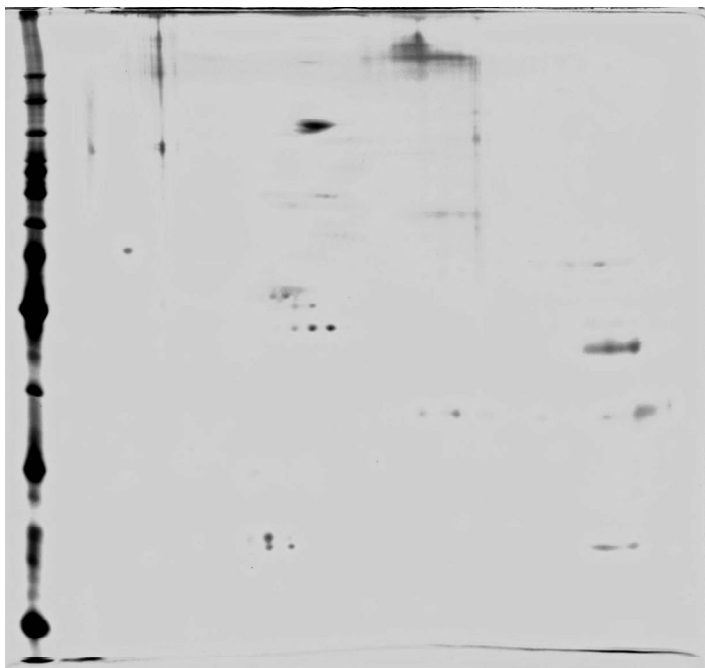
Gel 2-DE com proteínas re-hidratadas com solução 5



Protocolo 2: Os meios condicionados foram incubados com inibidores de proteases (1 mM PMSF e 10 μ M TLCK) e as proteínas do meio foram precipitadas com TCA, conforme protocolo 1. As proteínas precipitadas foram ressuspensas em 2M de uréia deionizada com 4% de CHAPS e incubadas por 16 h à -20°C. Ligações dissulfeto foram reduzidos com 10 mM de DTT (30 min em temperatura ambiente) e alquilados com 15 mM de iodoacetamida (IAA) e 10 mM de DTT (30 min em temperatura ambiente). Após foi adicionado 0,5% de IPG buffer (GE Healthcare) e 10% de isopropanol.

A concentração de proteína foi determinado com kit 2D-Quant (GE Healthcare Amersham Biosciences, USA) e 150 μ g de proteínas foram solubilizadas em volume total de 100 μ l na solução de re-hidratação (8 M de uréia, 2% de CHAPS e 0,002% de azul de bromofenol).

Gel 2-DE com proteínas preparadas conforme protocolo 2



ANEXO III

Tabela de todas as proteínas identificadas pelo MALDI-TOF/TOF. As dez primeiras proteínas foram consideradas significativas com valores de $EV \leq 10^{-3}$ e as demais não foram significativas com valores de $EV \geq 10^{-3}$.

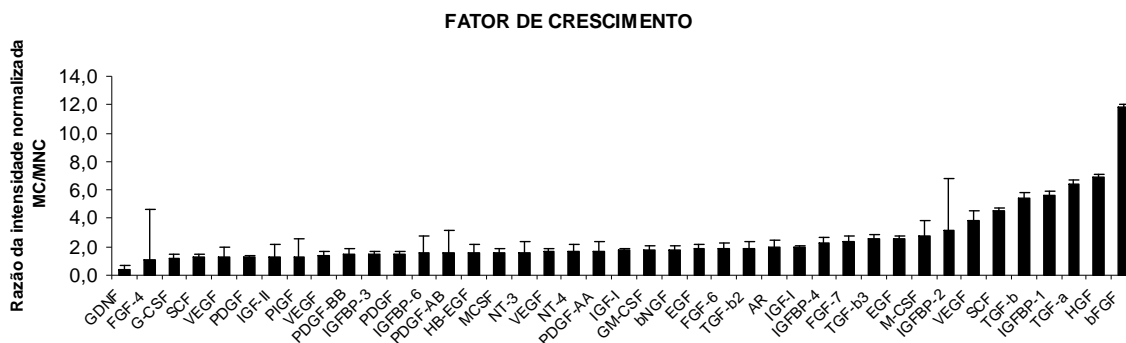
Proteína	EV	gene ID
TPI1 triosephosphate isomerase 1	5,60E-13	7167
ACTN3 actinin, alpha 3	3,50E-08	89
ACTA2 actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	5,50E-05	59
MDH1 malate dehydrogenase 1	8,00E-05	4190
DCI dodecenoyl-coenzyme A delta isomerase	3,80E-04	1632
MyBPC cardiac myosin binding protein C	4,20E-04	4607
SOD 2 superoxide dismutase 2 mitochondrial	5,70E-04	6648
ACTC1 actin, alpha, cardiac muscle 1	1,00E-03	70
MYL4 myosin, light chain 4	4,00E-03	4635
MYLK myosin light chain kinase	5,90E-03	4638
ATP5B mitochondrial ATP synthase	9,10E-03	506
PIAS-NY protein	2,40E-02	100131674
PRDX3 peroxiredoxin 3_CRA-c	3,10E-02	10935
ENO 3 enolase 3	5,90E-02	2027
ECHS1 enoyl Coenzyme A hydratase 1	2,90E-01	1892
CKM creatine kinase M	3,50E-01	1158
IL22 Interleukin 22	3,5	50616
ACTG2 actin, gamma 2 propeptide	5,2	72
ENO 1 crystal structure of human enolase 1	6,3	2023
HLA-DRB4 major histocompatibility complex, DR beta 4	15	3126
UMODL1 uromodulin-like 1 protein variant 7	1,20E+02	89766

ANEXO IV

Tabela com todos os fatores de crescimento possíveis de serem identificados no arranjo de anticorpos. Resultados obtidos da subtração dos valores de backgrounds e calculados em relação à média do controle positivo. Os valores normalizados foram copiados para o software estatístico GraphPad Prism 5. Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média e comparações entre os grupos foram feitos por “two-way ANOVA”. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

FC	VI	Valor P	
GDNF	0,4	$P > 0.05$	ns
FGF-4	1,0	$P > 0.05$	ns
G-CSF	1,1	$P > 0.05$	ns
SCF	1,2	$P > 0.05$	ns
VEGF	1,3	$P > 0.05$	ns
PDGF	1,3	$P > 0.05$	ns
IGF-II	1,3	$P > 0.05$	ns
PIGF	1,3	$P > 0.05$	ns
VEGF	1,4	$P > 0.05$	ns
PDGF-BB	1,4	$P > 0.05$	ns
IGFBP-3	1,5	$P > 0.05$	ns
PDGF	1,5	$P > 0.05$	ns
IGFBP-6	1,6	$P > 0.05$	ns
PDGF-AB	1,6	$P > 0.05$	ns
HB-EGF	1,6	$P > 0.05$	ns
MCSF	1,6	$P > 0.05$	ns
NT-3	1,6	$P > 0.05$	ns
VEGF	1,7	$P > 0.05$	ns
NT-4	1,7	$P > 0.05$	ns
PDGF-AA	1,7	$P > 0.05$	ns
IGF-I	1,7	$P > 0.05$	ns
GM-CSF	1,8	$P > 0.05$	ns
bNGF	1,8	$P > 0.05$	ns
EGF	1,8	$P > 0.05$	ns
FGF-6	1,9	$P > 0.05$	ns
TGF-b2	1,9	$P > 0.05$	ns
AR	2,0	$P > 0.05$	ns
IGF-I	2,0	$P > 0.05$	ns
IGFBP-4	2,2	$P > 0.05$	ns
FGF-7	2,4	$P > 0.05$	ns
TGF-b3	2,5	$P > 0.05$	ns
EGF	2,5	$P < 0.001$	***
M-CSF	2,7	$P > 0.05$	ns
IGFBP-2	3,2	$P < 0.001$	***
VEGF	3,8	$P > 0.05$	ns
SCF	4,5	$P > 0.05$	ns
TGF-b	5,4	$P < 0.001$	***
IGFBP-1	5,7	$P < 0.01$	**
TGF-a	6,4	$P > 0.05$	ns
HGF	6,9	$P < 0.001$	***
bFGF	11,9	$P < 0.001$	***

Legenda: FC: fator de crescimento; VI: Razão dos valores de intensidade normalizados.

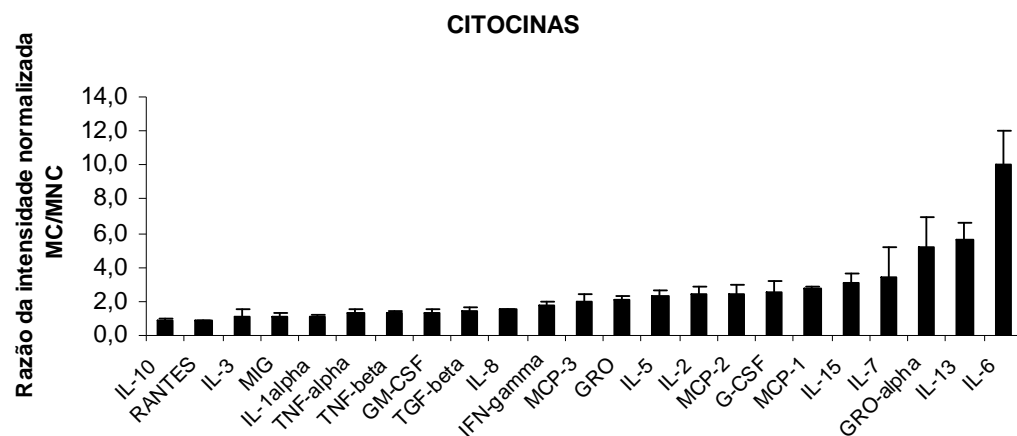


Eixo Y representa a razão das intensidades dos spots normalizadas. As barras de erro representam o desvio padrão das quatro replicatas biológicas.

Tabela com todas as citocinas possíveis de serem identificados no arranjo de anticorpos. Resultados obtidos da subtração dos valores de backgrounds e calculados em relação à média do controle positivo. Os valores normalizados foram copiados para o software estatístico GraphPad Prism 5. Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média e comparações entre os grupos foram feitos por “two-way ANOVA”. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

CC	VI	Valor P	
IL-10	0,9	$P > 0.05$	ns
RANTES	0,9	$P > 0.05$	ns
IL-3	1,1	$P > 0.05$	ns
MIG	1,1	$P > 0.05$	ns
IL-1alpha	1,1	$P > 0.05$	ns
TNF-alpha	1,3	$P > 0.05$	ns
TNF-beta	1,3	$P > 0.05$	ns
GM-CSF	1,3	$P > 0.05$	ns
TGF-beta	1,4	$P > 0.05$	ns
IL-8	1,5	$P < 0.05$	*
IFN-gamma	1,7	$P > 0.05$	ns
MCP-3	2,0	$P > 0.05$	ns
GRO	2,1	$P < 0.001$	***
IL-5	2,4	$P > 0.05$	ns
IL-2	2,4	$P > 0.05$	ns
MCP-2	2,4	$P > 0.05$	ns
G-CSF	2,5	$P > 0.05$	ns
MCP-1	2,8	$P < 0.001$	***
IL-15	3,1	$P > 0.05$	ns
IL-7	3,4	$P > 0.05$	ns
GRO-alpha	5,2	$P > 0.05$	ns
IL-13	5,6	$P > 0.05$	ns
IL-6	10,0	$P < 0.001$	***

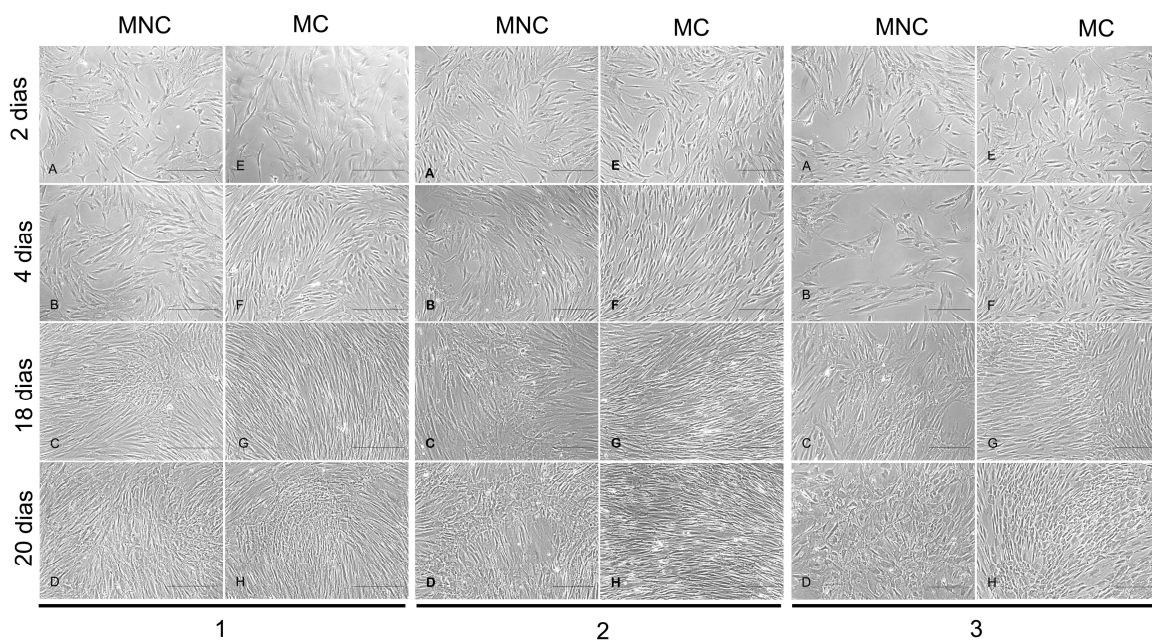
Legenda: CC: citocinas; VI: Razão dos valores de intensidade normalizados.



Eixo Y representa a razão das intensidades dos spots normalizadas. As barras de erro representam o desvio padrão das quatro replicatas biológicas.

ANEXO V

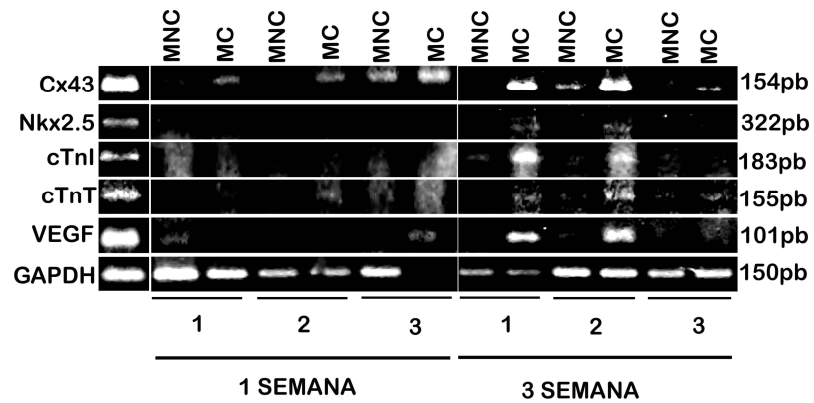
Avaliação temporal do aumento de número de células por microscopia óptica.



Os dias de tratamento são mostrados no lado esquerdo e o tipo de meio utilizado nos cultivos das CTMs acima (MC ou MNC). Barra da escala= 30 µm.

ANEXO VI

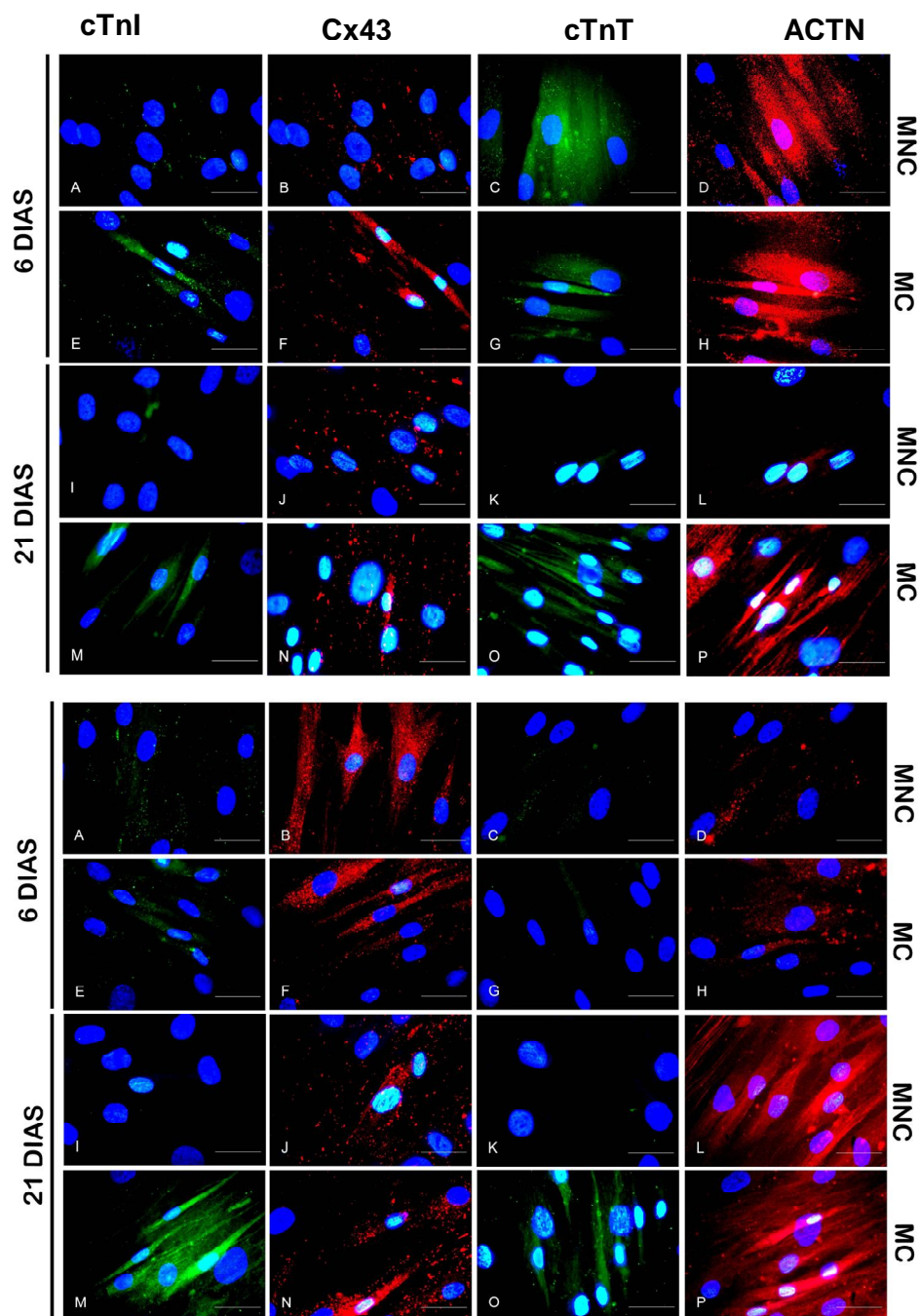
Fotos das RT-PCRs das duas semanas de cultivo. É possível observar que na primeira semana apenas a expressão do gene conexina-43 é visualizado nas três réplicas biológicas tratadas com MC.



Abreviações: Cx43: conexina 43; cTnI: troponina I; cTnT: troponina T; Nkx2.5: fator transcricional relacionado ao locus 5; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; MNC: meio não condicionado; MC: meio condicionado.

ANEXO VII

Imunofluorescência das demais réplicas biológicas



Os marcadores utilizados para as análises de imunofluorescência estão indicados em cima da figura. Os dias de tratamento são mostrados no lado esquerdo e o tipo de meio utilizado nos cultivos das CTMs no lado direito (MC ou MNC). Os núcleos estão marcados com DAPI. Abreviações: Cx43, Conexina-43; cTnI, troponina cardíaca I; cTnT, troponina cardíaca T; ACTN, α -actinina. Barra da escala= 30 μ m.